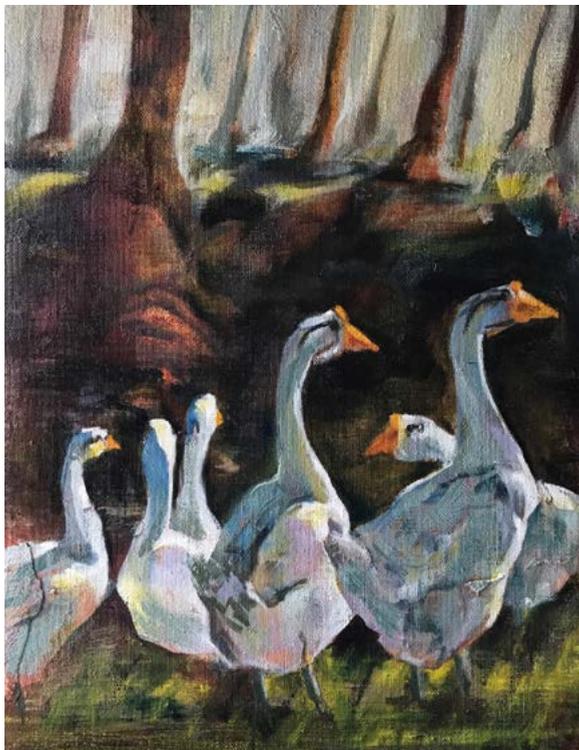




**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARIA**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria
2022**



**LXI CONVEGNO NAZIONALE SIPA
VII SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**Rimini (RN), 6 Maggio 2022
Forlì (FC), 28 Ottobre 2022**

In copertina: dipinto olio su tela di Amelio Meini

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2022**

Rimini (RN), 6 Maggio 2022

Forlì (FC), 28 Ottobre 2022



INDICE

Prefazione pag. 17

ATTI DEL LXI CONVEGNO NAZIONALE SIPA

Rimini (RN), 6 Maggio 2022

CONVEGNO

INFLUENZA AVIARIA: UNA SFIDA APERTA PER IL SETTORE AVICOLO

- EPIDEMIA HPAI H5N1 IN ITALIA
Terregino C. pag. 21
- PROPOSTE TECNICHE PER UNA GESTIONE EFFICACE DELLE FUTURE EPIDEMIE DA VIRUS INFLUENZALI IN ITALIA
Catania S. pag. 43

ATTI DEL VII SIMPOSIO SCIENTIFICO

Forlì (FC), 28 Ottobre 2022

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- MISCELE MICROINCAPSULATE DI SOSTANZE AROMATIZZANTI E ACIDI ORGANICI COME SUPPLEMENTI ALIMENTARI PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE NECROTICA DA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN POLLI DA CARNE
Tugnoli B., Piva A., Grilli E. pag. 63
- EFFETTO DI UNA MISCELA DI SOSTANZE AROMATIZZANTI E ACIDI ORGANICI CONTRO *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN-VITRO
Ghiselli F., Giovagnoni G., Felici M., Tugnoli B., Piva A., Grilli E. pag. 69
- EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE DIETETICA CON CITROBEX® SUL MICROBIOMA INTESTINALE DEL BROILER
De Cesare A., Indio V., Lucchi A., Pasquali F., Parra Titos E., Bertuzzi S., Manfreda G. pag. 81

- EPIDEMIA ITALIANA DI HPAI H5N1 CLADE 2.3.4.4B (2021-2022): INFEZIONE SILENTE IN UN ALLEVAMENTO INDUSTRIALE DI BROILER
Gobbo F., Zanardello C., Bottinelli M., Budai J., Bruno F., De Nardi R., Patregnani T., Catania S., Terregino C. pag. 91

- STRATEGIA DI DIFFERENZIAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DA CEPPI DI CAMPO DEL VIRUS DELL'INFLUENZA (SOTTOGRUPPO H5) E DA VACCINI RICOMBINANTI
Lesceu S., Gaimard M., Redal C., Drus J-E., Lefebvre C., Pourquier P. pag. 99

- RIDUZIONE DELL'ABBONDANZA RELATIVA DI *HELICOBACTER PUL-LORUM* NEL MICROBIOTA CECALE DI POLLI ALLEVATI CON SISTEMA FREE-RANGE
Borrelli L., Varriale L., Coretti L., Pace A., Russo T.P., Santaniello A., Gavazzi L., Lembo F., Fioretti A., Dipineto L. pag. 107

- DIFFUSIONE DI SALMONELLE MULTI-RESISTENTI E DEI DETERMI-NANTI GENETICI DI ANTIMICROBICO RESISTENZA NELLA FILIERA AN-TIBIOTIC-FREE DEL POLLO DA CARNE DEL CENTRO ITALIA
Di Francesco C.E., Ferri G., Smoglica C., Festino A.R., Ruffini F., Marsilio F., Vergara A. pag. 117

- MOLECULAR GENETIC SELECTION TO REDUCE *SALMONELLA TYPHI-MURIUM* CIRCULATIONS IN CHICKENS
Saleh M., Pugliese N., Schiavone A., Samarelli R., Circella E., Siddique I., Camarda A. pag. 125

- MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI IMMUNOISTOCHEMICA PER *RIEMERELLA ANATIPESTIFERA* A FINI DIAGNOSTICI
Zanardello C., Bano L., Drigo I., Bonfante F., Gobbo F., Zandonà L., Vascellari M. pag. 133

- RILIEVI CLINICI, ANATOMOPATOLOGICI E DIAGNOSTICI RACCOLTI NEL CORSO DELLA MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI RIPRO-DUZIONE SPERIMENTALE DELLA RIEMERELLOSI NEL TACCHINO DA CARNE
Zandonà L., Rizzardi A., Guolo A., Tonon E., Drigo I., Gobbo F., Bonfante F., Terregino C., Bano L. pag. 139

- VALUTAZIONE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DI CAMPO E VAC-CINALI TRAMITE METODICA MULTI LOCUS VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS ANALYSIS (MLVA): RISULTATI PRELIMINARI
Stefani E., Matucci A., Gastaldelli M., Cristovao Borges L., Righetti V., Vianello S., Tondo A., Catania S. pag. 147

- VALUTAZIONE DI UN METODO DIAGNOSTICO PREDITTIVO DELLA SPONDILITE ENTEROCOCCICA IN GRUPPI DI BROILER COMMERCIALI
Cordioli B., Bacchin C., Palazzolo L., Rizzardi A., Montagner A., Zarpellon G., Bottin S., Guolo A., Drigo I., Bano L. pag. 157

- RUOLO DI *MUSCA DOMESTICA* COME VETTORE IN UN EPISODIO DI BOTULISMO OSSERVATO IN ALLEVAMENTO COMMERCIALE DI QUAGLIE (*COTURNIX COTURNIX*)
Palazzolo L., Camarda A., Cordioli B., Cornaggia M., Di Castri A., Drigo I., Rizzardi A., Zarpellon G., Strepapola G., Viel L., Bano L. pag. 163

- RESISTENZA DI *DERMANYSSUS GALLINAE* A PHOXIM E PIRETROIDI: LA SITUAZIONE STA CAMBIANDO?
Schiavone A., Pugliese N., Siddique I., Samarelli R., Saleh M., Circella E., Romito D., Camarda A. pag. 169

- IL LATO OSCURO DELLA QUALITÀ: INTOSSICAZIONE DA MICOTOSSINE IN UN ALLEVAMENTO PER LA PRODUZIONE DI UOVA ARRICCHITE IN OMEGA-3
Pugliese N., Samarelli R., Dimuccio M.M., Bozzo G., Ceci E., Schiavone A., Circella E., Saleh M., Siddique I., Crescenzo G., Camarda A. pag. 175

- RUOLO DELL'INCUBATOIO NELL'EPIDEMIOLOGIA DELLA RUN-TING-STUNTING SYNDROME (RSS) E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI *AVIAN NEPHRITIS VIRUS* (ANV)
Grego E., Bertolotti L., Stella M.C., Catania A.M., Castellina C. pag. 185

- AGGIORNAMENTO EPIDEMIOLOGICO SUL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA IN EUROPA OCCIDENTALE
Legnardi M., Franzo G., Tucciarone C.M., Tonellato F.R., Koutoulis K.C., Cecchinato M. pag. 191

- VACCINI O CEPPINO DI CAMPO? LEZIONI DALLA VARIANTE 2
Franzo G., Tucciarone C.M., Homonnay Z., Dauphin G., Koutoulis K.C., Cecchinato M., Legnardi M. pag. 203

- IMPIEGO DEL VACCINO RICOMBINANTE RN1250 PER IL CONTROLLO DELLA MALATTIA DI MAREK: CINETICA VACCINALE ED EFFICACIA IN RIPRODUTTORI PESANTI
Lupini C., Quaglia G., Benedetti V., Mescolini G., Prandini F., Tovani A., Catelli E. pag. 213

- STUDIO *IN VIVO* DELL'EFFICACIA DI UN SISTEMA DI LAMPADE A UVC A 222 NM PER L'INATTIVAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA
Tucciarone C.M., Cecchinato M., Vianello L., Simi G., Morandin M., Borsato E., Silvestrin L., Giorato M., Salata C., Greggio E., Drigo M. pag. 219

- INDAGINI PRELIMINARI SUL RUOLO RIVESTITO DA VOLATILI SELVATICI COME POTENZIALI RESERVOIR DI MICRORGANISMI ANTIBIOTICO-RESISTENTI
Musa L., Casagrande Proietti P., Stefanetti V., Toppi V., Gobbi M., Costantino I., Aisa F., Brescia M., Franciosini M.P. pag. 225

- *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *CAMPYLOBACTER COLI* IN VOLATILI SELVATICI: PREVALENZA E RESISTENZA ANTIMICROBICA
Casalino G., D'Amico F., Napoletano V., Camarda A., Bove A., Dimuccio M.M., Dinardo F.R., Lombardi R., D'Onghia F., Circella E. pag. 235

- UTILIZZO DELL'ASSOCIAZIONE ATOVAQUONE/PROGUANILE CLORIDRATO PER IL TRATTAMENTO DELLA MALARIA AVIARE NELLE CIVETTE DELLE NEVI (*BUBO SCANDIACUS*)
Samarelli R., Pugliese N., Lombardi R., Schiavone A., Circella E., Saleh M.S., Cafiero M., Raele D., Siddique I., Camarda A. pag. 245

- STUDIO SULL'ANTIBIOTICO SENSIBILITA' DI BATTERI PATOGENI ISOLATI DA CANARINI E PAPPAGALLI
Leone S., Bottinelli M., Alessandri G., Fiorini P., Di Schiavi M., Vesentini G., Merenda M., Catania S. pag. 253

- **INDICE DEGLI AUTORI** **pag. 261**

ROSS 308 DELIVERS

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

Visit www.aviagen.com/Ross
to learn how Ross® 308
will deliver for you.



Aviagen®



Il pacchetto completo BioChek per la diagnostica delle malattie del pollame e dei suini è utilizzato in tutto il mondo.

Offriamo un servizio diagnostico avanzato su misura, che comprende kit ELISA e PCR, assistenza in tutto il mondo e software di monitoraggio.

BioChek offre:

- Kit di test ELISA e PCR per la diagnostica del pollo e dei suini.
- Controlli di riferimento con i nostri kit ELISA
- Standard per i nostri kit di analisi PCR
- Il nostro software di monitoraggio di facile utilizzo per una facile gestione dei dati
- Diagnostica automatizzata: il BioChek ELISA Assay Robot (BEAR)
- Assistenza in tutto il mondo grazie ai nostri product manager regionali

BioChek fornisce assistenza tecnica, formazione e addestramento, garantendo la facilità d'uso dei nostri prodotti e la realizzazione di risultati sicuri.

Abbiamo sviluppato manuali e linee guida per l'esecuzione dei nostri test e per l'interpretazione dei risultati. In breve, offriamo un supporto e un servizio completo in tutte le aree del nostro settore.

Questo elevato livello di servizio ha un obiettivo comune: una diagnostica estremamente estremamente accurata e affidabile che renda possibili interventi veterinari ottimali. Aggiungiamo valore ai risultati dei vostri test. Il risultato: animali sani e un'azienda sana!



Contattateci per dare valore aggiunto ai risultati dei vostri test:

www.biochek.com • info@biochek.com • +31 (0)182 582 592
BioChek B.V. - Fokkerstraat 14 - 2811ER Reeuwijk - the Netherlands

Per l'Italia contatta il nostro responsabile:

Cesare Covanti • cesarecovanti@biochek.com • 348 4090967

XXI

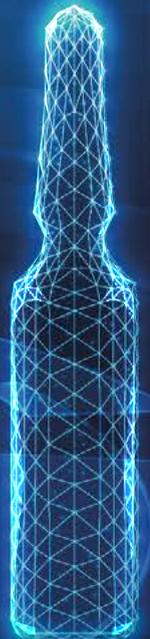


IL FUTURO NELLA GESTIONE DELLA **MALATTIA DI MAREK**

INNOVAZIONE

PROTEZIONE

VALORE
AGGIUNTO



LESS IS
MORE

**SEMPLIFICA IL PROGRAMMA DI VACCINAZIONE
NELLE OVAIOLE CON I VACCINI CEVA AD ALTA INNOVAZIONE**

Raggiungi i tuoi obiettivi in termini di sicurezza
ed efficacia, con meno applicazioni

ASSOCIAZIONE VINCENTE

GLUTARALDEIDE

BENZALCONIO



Glutarsan®



EFFICACIA
CERTIFICATA

BATTERI

MUFFE
e LIEVITI

VIRUS

DISINFEZIONE INTEGRALE

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





Cosa significa uno 0,01 di Conversione Alimentare per la tua azienda?

Scopri lo qui



www.bit.ly/1puntofcr

Il Cobb500 fornisce un vantaggio significativo quando si tratta di ridurre il tuo costo di produzione.

Questo si ottiene con un'alimentazione meno cara, come dall'ottenere **3 punti in meno di Conversione Alimentare** e lo **0,60% in più di resa commerciabile.**

cobb-vantress.com

Coccidiosi?
La soluzione Elanco per
proteggere e migliorare
l'Integrità Intestinale.

Elanco

Fai la scelta giusta.

L'azione sinergica di narasin e nicarbazina e la combinazione ottimale del loro dosaggio consentono a Maxiban™ un controllo ideale della coccidiosi, migliorando l'integrità intestinale (I²) e la sostenibilità delle tue produzioni.

Elanco

Maxiban™

la scelta giusta

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2022
sono realizzate grazie al contributo di:



PREFAZIONE

Legnaro (PD), 24 agosto 2022

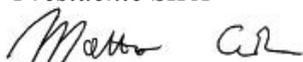
Come consuetudine, pubblichiamo gli Atti del LXI Convegno Nazionale e del VII Simposio Scientifico.

Il nostro convegno, in collaborazione con l'Associazione Scientifica di avicoltura (sezione Italiana della WPSA), si è collocato all'interno del Poultry Forum, a Rimini, dove sono stati affrontati gli argomenti più importanti che interessano la filiera avicola. La mattinata è iniziata trattando il tema del "benessere animale" in avicoltura e in particolare nel settore delle galline ovaiole con la gestione dei pulcini maschi. Nuove tecnologie e prospettive per il sessaggio in ovo sono state presentate da relatori di caratura internazionale. Successivamente il focus si è spostato sulla epidemia di influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI), iniziata nell'autunno 2021, che ha interessato diversi Paesi europei tra cui l'Italia causando gravi danni alla filiera avicola, fiore all'occhiello della zootecnia italiana. Proprio per analizzare la situazione epidemiologica, approfondire le caratteristiche del virus e valutare le misure di controllo introdotte, la SIPA ha scelto come tema per il suo LXI Convegno annuale proprio l'influenza aviare indicandola come "una sfida aperta per il settore avicolo". Il dott. Calogero Terregino, dirigente veterinario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) nonché responsabile del Centro di Referenza Nazionale ed europeo per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle, ha descritto le peculiarità di tale epidemia e del virus responsabile e il Dott. Salvatore Catania, dirigente presso l'IZSve a Verona, ha illustrato le proposte tecniche per una gestione efficace delle future epidemie da virus influenzali in Italia basandosi sull'esperienza del gruppo di lavoro istituito proprio a seguito di tale epidemia. Infine, il Prof. Jean-Luc Guerin, dell'Università di Tolosa, ha condiviso la sua esperienza nella gestione dell'Influenza aviare negli ultimi 5 anni in Francia.

Il VII Simposio Scientifico si terrà a Forlì il 28 ottobre presso la bellissima sede dell'EX Convento San Domenico. Quest'anno oltre alle numerose relazioni presentate dai soci ci sarà un momento di discussione sulle sfide sanitarie ed economiche emergenti per la filiera avicola italiana. Mi rende sempre molto orgoglioso e speranzoso per il futuro della nostra società, il numero, la qualità delle relazioni presentate e l'allargamento dei gruppi di ricerca che svolgono attività nell'ambito della patologia aviare.

Mi preme infine ricordare con affetto due colleghi, la Prof.ssa Francesca Menna dell'Università di Napoli e il Dott. Enrico Alessandri, che hanno partecipato e contribuito alle attività della nostra società ed in generale alla patologia aviare italiana, e che nel corso del 2022 ci hanno lasciato.

Prof. Mattia Cecchinato
Presidente SIPA





ATTI DEL LXI CONVEGNO NAZIONALE SIPA

CONVEGNO

**INFLUENZA AVIARIA:
UNA SFIDA APERTA
PER IL SETTORE AVICOLO**

Rimini (RN), 6 Maggio 2022

EPIDEMIA HPAI H5N1 IN ITALIA

Terregino C.

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

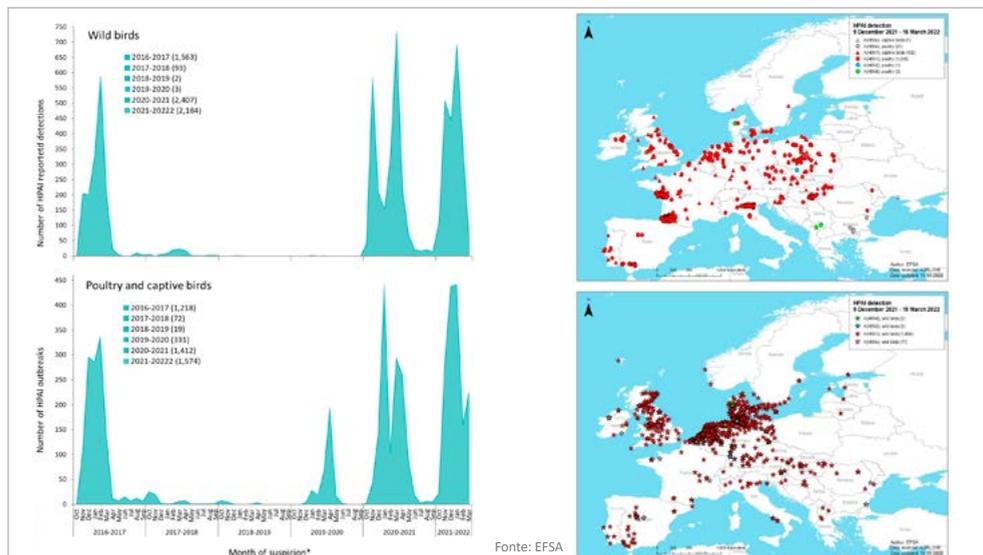


Epidemia HPAI H5N1 in Italia

Calogero Terregino
Laboratorio di Referenza Europeo/OIE/FAO e Centro di Referenza nazionale per l'influenza aviaria e la malattia di Newcastle
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

LXI Convegno annuale SIPA
6 maggio 2022

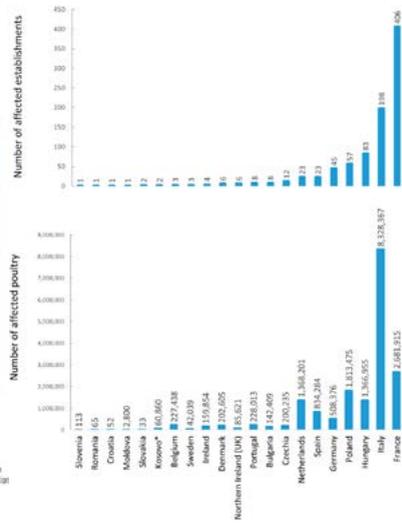




The worst HPAI epidemics in EU

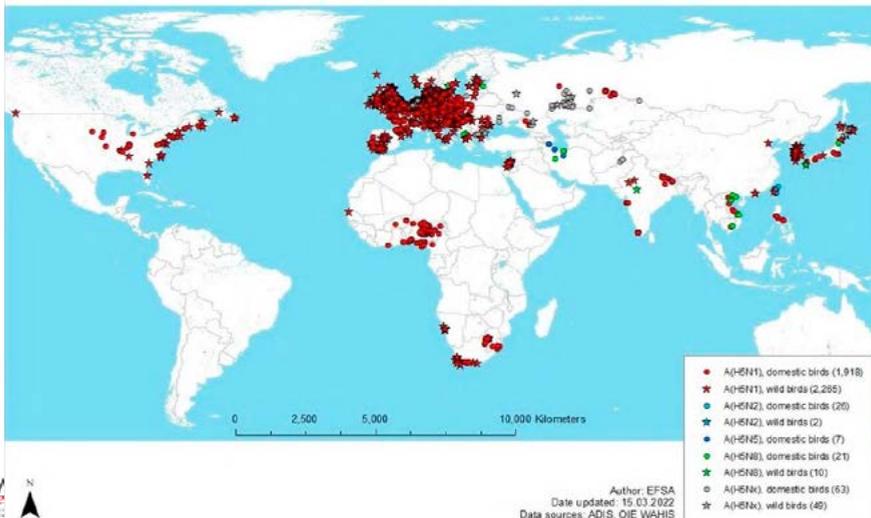
Epidemic season	Number of Member States affected	HPAI virus serotypes	Wild birds detections	Poultry outbreaks	Number of poultry affected in outbreaks
2016/2017	22	H5N5, H5N6, H5N8	1563	1132	~ 9 million
2020/2021	24	H5N1, H5N3, H5N4, H5N5, H5N8	2330	1241	> 23 million
2021/2022*	25	H5N1, H5N2, H5N3, H5N8	2181	1691	> 35 million

* 1 Oct. 2021 – 27 Mar. 2022

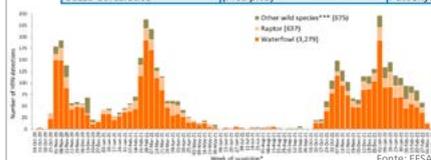


Fonte: EFSA

HPAI detections in domestic and wild birds from October 2021 to March 2022 (4,361)



NOME COMUNE	NOME SCIENTIFICO	ORDINE	HPAI H5	HPAI H5N1	HPAI H5N8	HPAI H5N3	HPAI H5N2	TOTALE
Oca facciabianca	<i>(Branta leucopsis)</i>	Anseriformes	3	524	1	0	0	528
Cigno reale	<i>(Cygnus olor)</i>	Anseriformes	10	414	0	0	0	424
Oca selvatica	<i>(Anser anser)</i>	Anseriformes	10	302	1	0	0	313
Poiana comune	<i>(Buteo buteo)</i>	Accipitriformes	0	110	0	0	0	110
Cygnus	<i>(Cygnus sp.)</i>	Anseriformes	0	90	0	1	2	93
Gabbiano reale nordico	<i>(Larus argentatus)</i>	Charadriiformes	1	70	0	0	0	71
Germano reale	<i>(Anas platyrhynchos L.)</i>	Anseriformes	1	58	10	0	0	69
Anatidae	<i>(Anatidae)</i>	Anseriformes	1	51	0	0	0	52
Fischione	<i>(Mareca penelope)</i>	Anseriformes	1	50	0	0	0	51
Ardeidae	<i>(Ardeidae)</i>	Pelecaniformes	0	48	0	0	0	48
Oca del Canada	<i>(Branta canadensis L.)</i>	Anseriformes	0	36	10	0	0	46
Cicogna europea	<i>(Ciconia ciconia)</i>	Ciconiiformes	1	37	0	0	0	38
Gabbiano comune	<i>(Chroicocephalus ridibundus)</i>	Charadriiformes	0	33	0	0	0	33
Cigno selvatico	<i>(Cygnus cygnus)</i>	Anseriformes	0	31	2	0	0	33
Laridae	<i>(Laridae)</i>	Charadriiformes	0	32	0	0	0	32
Gambecchio semipalmato	<i>(Calidris pusilla)</i>	Charadriiformes	0	27	0	0	0	27
Airone cinerino	<i>(Ardea cinerea)</i>	Pelecaniformes	1	24	0	0	0	25
Oca lombardella maggiore	<i>(Anser albifrons)</i>	Anseriformes	2	21	0	0	0	23
Falga comune	<i>(Fulica atra)</i>	Gruiformes	0	19	0	0	0	19
Mughalaccio	<i>(Larus marinus)</i>	Charadriiformes	0	19	0	0	0	19
Volatile selvatico ns	-	-	0	14	0	0	0	14
Accipiter	<i>(Accipiter sp.)</i>	Accipitriformes	0	14	0	0	0	14
Gazza eurasiatica	<i>(Pica pica)</i>	Passeriformes	0	12	0	0	0	12



In totale le specie identificate sono settantasei (n=76), appartenenti a 12 Ordini.



Fonte: EFSA

H5N1 HPAI – Volatili Selvatici

Regione	Specie	N. animali	Data Sospetto	Data Conferma
Lombardia	Germano reale	1	2021-10-28	2021-10-30
Lombardia	Fischione	1	2021-10-28	2021-10-30
Veneto	Gabbiano reale zampe gialle	1	2021-11-16	2021-11-16
Friuli Venezia Giulia	Gazza	1	2021-11-10	2021-11-17
Veneto	Oca selvatica	2	2021-11-23	2021-11-26
Veneto	Gheppio	1	2021-11-30	2021-11-30
Lazio	Oca Selvatica Cigno reale	2	2021-11-26	2021-11-28
Veneto	Gabbiano reale zampe gialle	1	2021-11-29	2021-12-03
Lombardia	Gufo comune	3	2021-12-10	2021-12-14
Puglia	Airone cinerino	1	2021-11-29	2021-12-12
Veneto	Gabbiano reale zampegialle Gabbiano comune	2	2021-12-14	2021-12-16
Veneto	Gabbiano reale zampe gialle	1	2021-11-13	2021-12-18
Veneto	Civetta	1	2021-12-14	2021-12-21
Emilia Romagna	Gazza	4	2021-12-22	2021-12-27
Veneto	Alzavola	2	2021-12-17	2021-12-30
Veneto	Gabbiano (non specificato) Gufo Reale	1	2021-12-09	2021-12-29
Campania	Aquila di Harris Falco sacro	3	2021-12-31	2021-12-31
Lombardia	Poiana	2	2022-01-19	2022-01-20
Piemonte	Cigno Reale	1	2022-01-27	2022-02-16
Piemonte	Airone bianco maggiore	1	2022-01-02	2022-02-16
Campania	Gufo comune	1	2022-01-31	2022-02-23
Campania	Gabbiano reale zampe gialle	1	2022-02-01	2022-02-23
Campania	Gheppio	1	2022-01-31	2022-02-23



● Situazione epidemiologica – aprile 2022

✓ FOCOLAI HPAI

SELVATICI (n. 23)

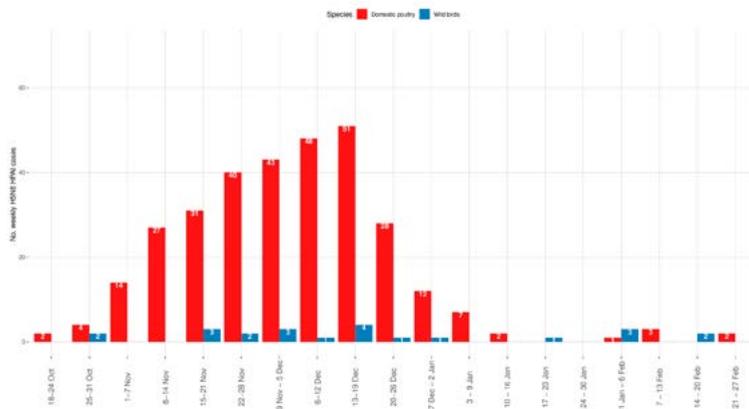
- 9 Veneto
- 4 Lombardia
- 4 Campania
- 2 Piemonte
- 1 FVG
- 1 Emilia Romagna
- 1 Lazio
- 1 Puglia

DOMESTICI (n. 317)

- 248 Veneto
- 60 Lombardia
- 4 Toscana
- 1 FVG
- 2 Emilia Romagna
- 1 Piemonte
- 1 Lazio



● Curva epidemica - 3 marzo 2022



Data di sospetto



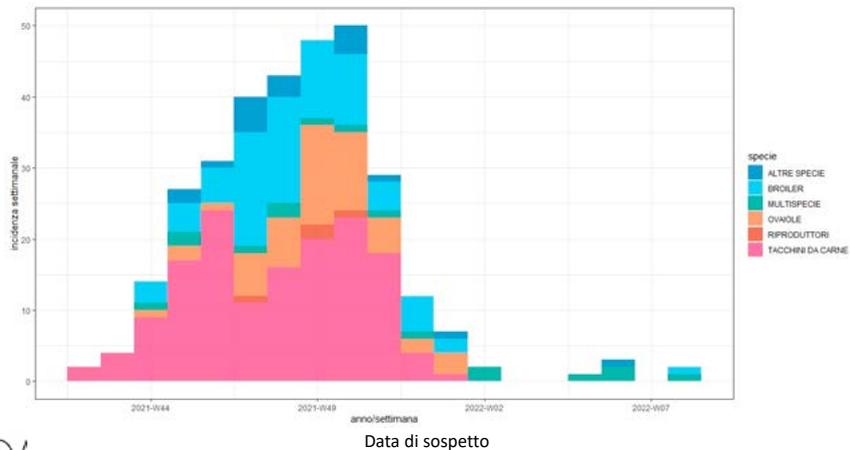
● H5N1 HPAI in Italia – Regione e Categoria

	Tacchini da carne	Broiler	Ovaiole	Riproduttori	Multi-specie ⁽¹⁾	Altre Specie ⁽²⁾	Totale
Emilia Romagna					1		1
Friuli Venezia Giulia		1					1
Lazio					1		1
Lombardia	20	9	20		5	6	60
Piemonte		1					1
Toscana					3		3
Veneto	129	65	32	5	6	11	248
Totale	149	76	52	5	16	17	315

(1) MULTISPECIE: 1 Parco, 1 Agriturismo, 1 Selvatici in cattività, 13 Rurali
 (2) ALTRE SPECIE: Quaglie, Fagiani, Anatre, Svezinatori, Faraone



● Curva epidemica per specie - 3 marzo 2022

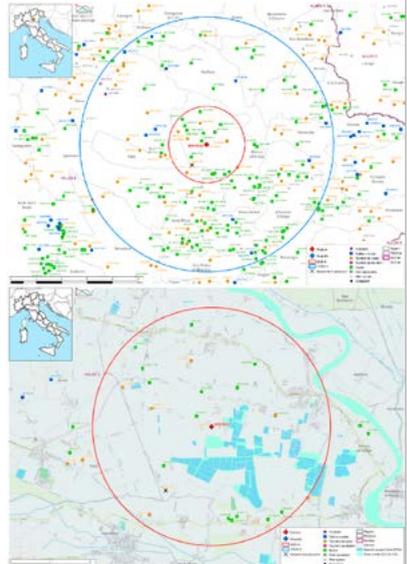


● **1° Focolaio (Ronco All'Adige) – tacchine femmine di @ 90gg**



● **1° Focolaio**

- Fattori di rischio
 - Zona ad alta densità di allevamenti avicoli (DPPA)
 - Circa 180 allevamenti entro 10 km
 - 22 in Zona di Protezione
 - 157 in Zona di Sorveglianza
- Alta presenza di zone umide
 - Cave/Riserva di caccia private a circa 300-500 m
 - Considerevole popolazione di anatidi selvatici
- Altro allevamento di tacchini da carne femmina degli stessi proprietari
 - Circa 13.500 capi
 - 88 giorni di età
 - Meno di 3 km di distanza



Focolai Ronco All'Adige (Verona)

Specie (n. animali presenti)	Data del sospetto	Data di conferma
Tacchini da carne (13.520)	18/10/2021	19/10/2021
Tacchini da carne (12.000)	19/10/2021	20/10/2021
Tacchini da carne (32.000)	25/10/2021	26/10/2021
Tacchini da carne (13.000)	26/10/2021	27/10/2021

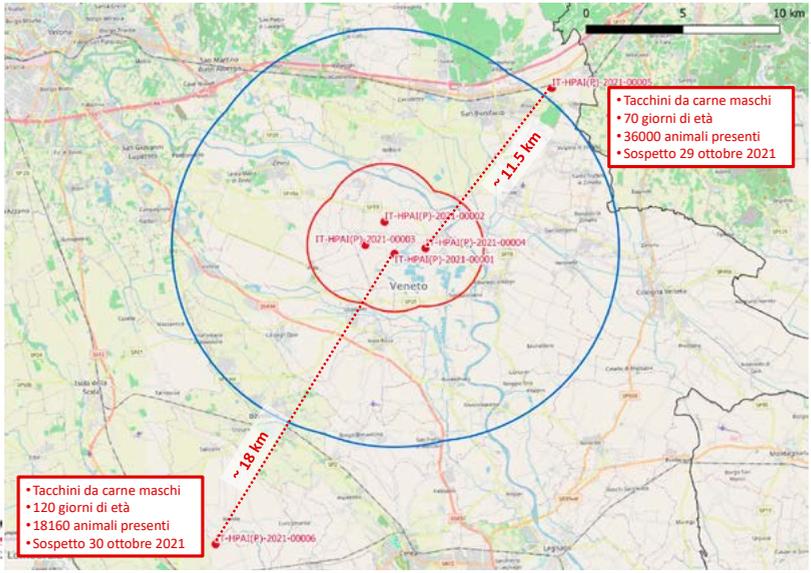
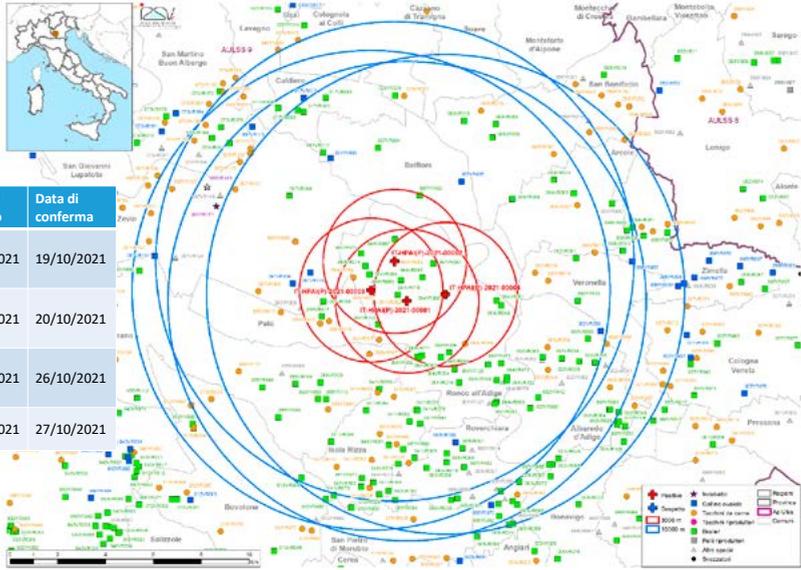
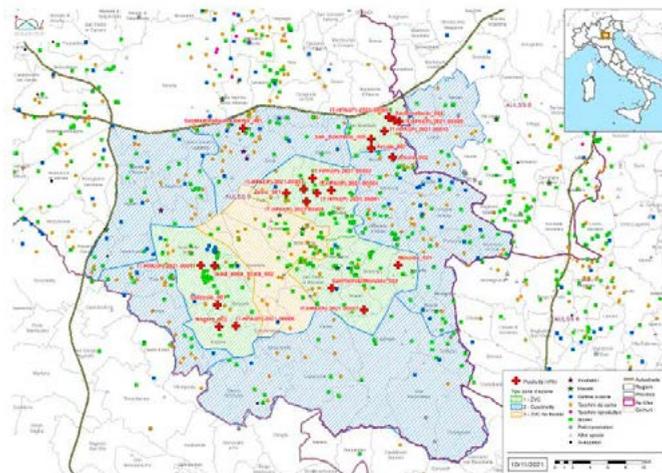
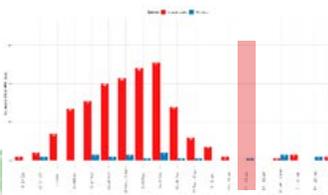


Figura 2 – Mappa aree cuscinetto e focolai confermati H5N1 HPAl (aggiornamento 09/11)



Settimana 14 – 17-23 Gennaio



	Dom	Sel
Veneto	248	9
Lombardia	58	3
Lazio	1	1
Friuli Venezia Giulia	1	1
Emilia Romagna	1	1
Puglia		1
Campania		1
Toscana	1	



IZSV
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Indagini Epidemiologiche

A red circle graphic is positioned in the bottom right corner of the slide.

● Indagini Epidemiologiche – Fattori di rischio

● Presenza aree umide

Regione	Si [%]	No [%]	N/I [%]	Totale Focolai
Veneto	146 [59%]	95 [38%]	7 [3%]	248
Lombardia	53 [88%]	4 [7%]	3 [5%]	60
Friuli Venezia Giulia	-	1 [100%]	-	1
Emilia Romagna	1 [100%]	-	-	1
Piemonte	-	-	1 [100%]	1
Toscana	3 [100%]	-	-	3
Lazio	1 [100%]	-	-	1
Totale	204 [65%]	100 [32%]	9 [3%]	315

● Presenza accertata di volatili selvatici

Regione	Si [%]	No [%]	N/I [%]	Totale Focolai
Veneto	51 [21%]	189 [76%]	8 [3%]	248
Lombardia	40 [67%]	11 [18%]	9 [15%]	60
Friuli Venezia Giulia	-	1 [100%]	-	1
Emilia Romagna	1 [100%]	-	-	1
Piemonte	-	-	1 [100%]	1
Toscana	3 [100%]	-	-	3
Lazio	1 [100%]	-	-	1
Totale	96 [30%]	201 [64%]	18 [6%]	315



● Indagine Epidemiologica – Fattori di rischio

● Ventilazione

Regione	Forzata	Agitatori	Naturale	N/I	Totale Focolai
Veneto	149	58	35	6	248
Lombardia	32	11	10	7	60
Friuli Venezia Giulia	1	-	-	-	1
Emilia Romagna	-	-	1	-	1
Piemonte	-	-	-	1	1
Toscana	-	-	3	-	3
Lazio	-	-	1	-	1
Totale	182	69	50	14	315



Contact tracing

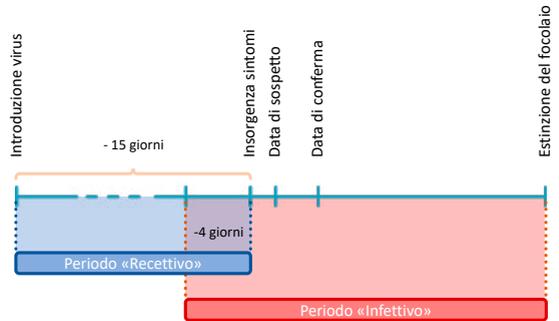


● Indagini Epidemiologiche – Rintraccio Contatti

- Tipi di contatti considerati
 - Movimento mezzi
 - Personale della filiera
 - Veterinario aziendale
 - Tecnico aziendale
 - Proprietario/Familiare
 - Prossimità ad altri focolai
- Contatti 'Direzionali'
- Contatti 'Non Direzionali'

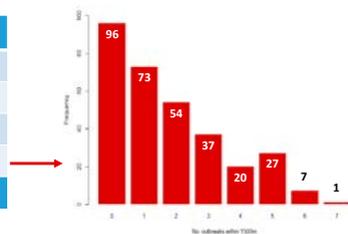
● Indagini Epidemiologiche – Rintraccio Contatti

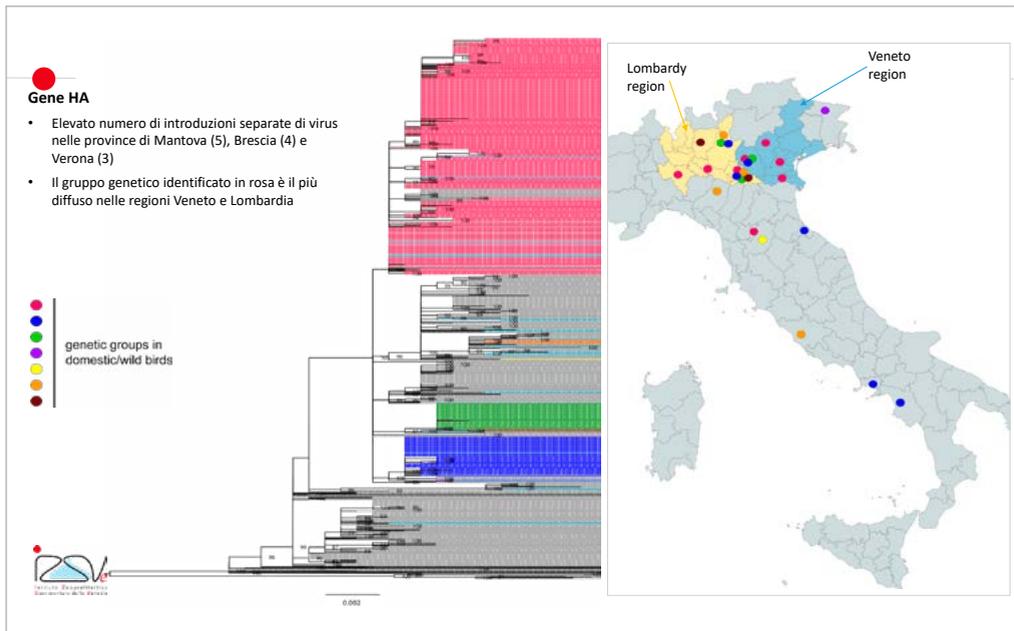
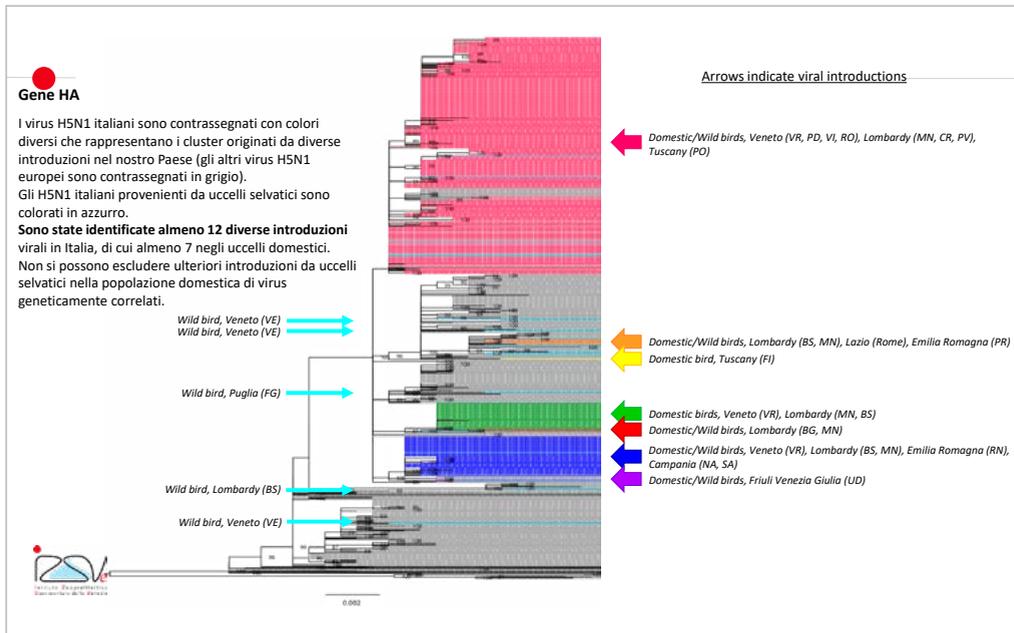
- **Periodo «recettivo»** (*Inbound risk*):
 - Probabile periodo in cui il virus potrebbe essere stato introdotto
 - Tracing back dei «contatti infetti»
- **Periodo «infettivo»** (*Outbound risk*):
 - Periodo in cui il virus potrebbe potenzialmente diffondersi dall'allevamento infetto
 - Tracing forward dei «contatti infettivi»

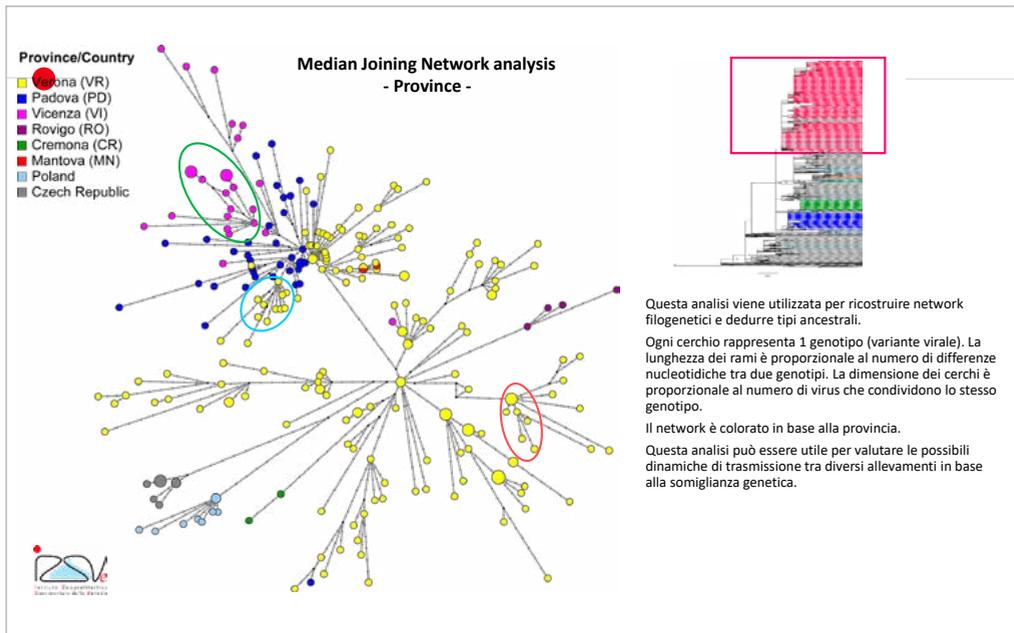
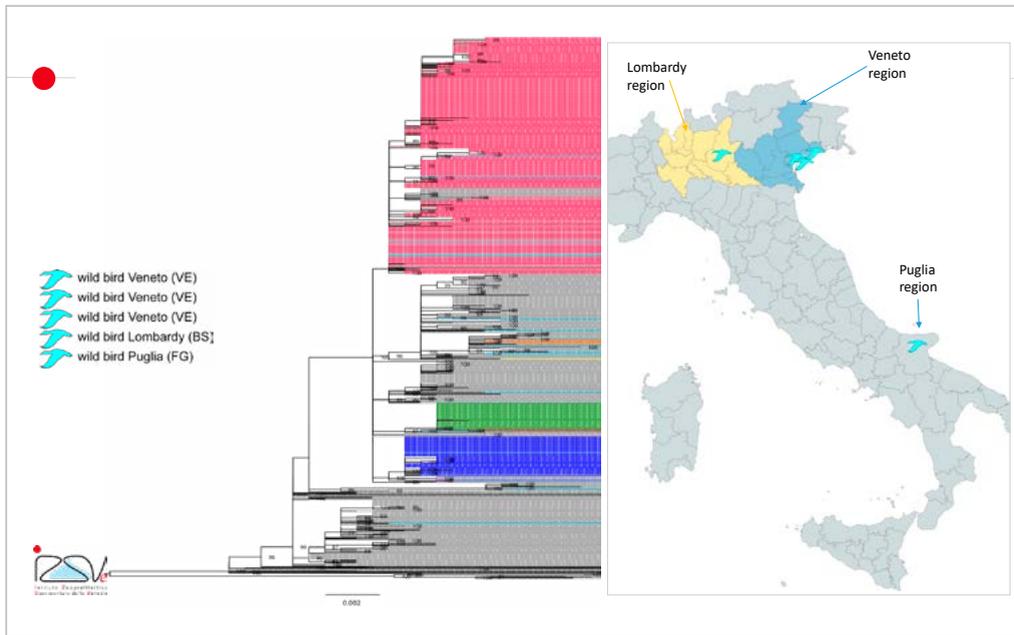


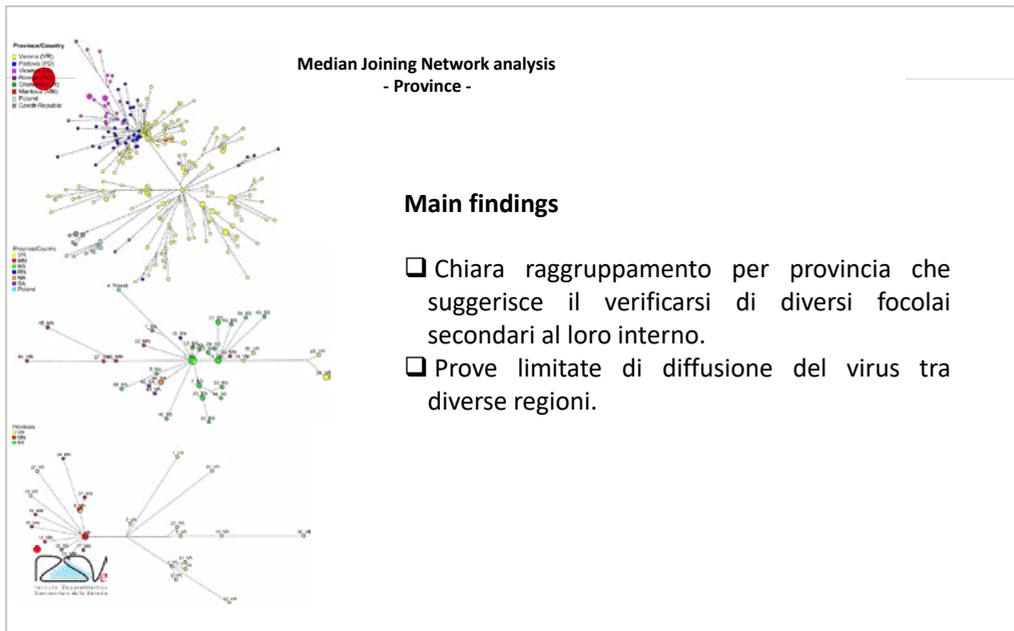
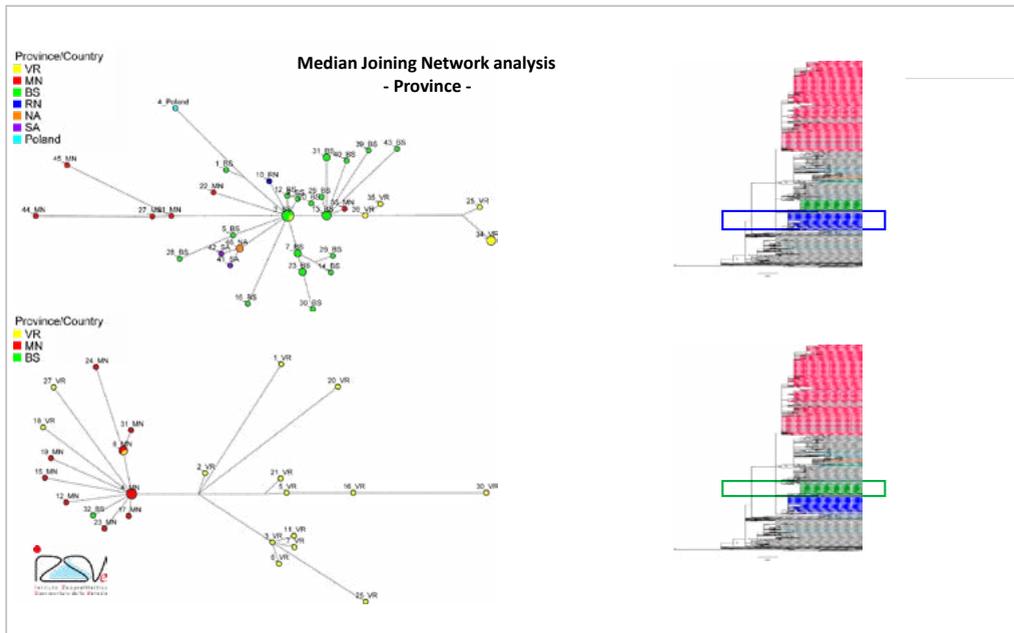
● Indagini Epidemiologiche – probabile causa del contagio

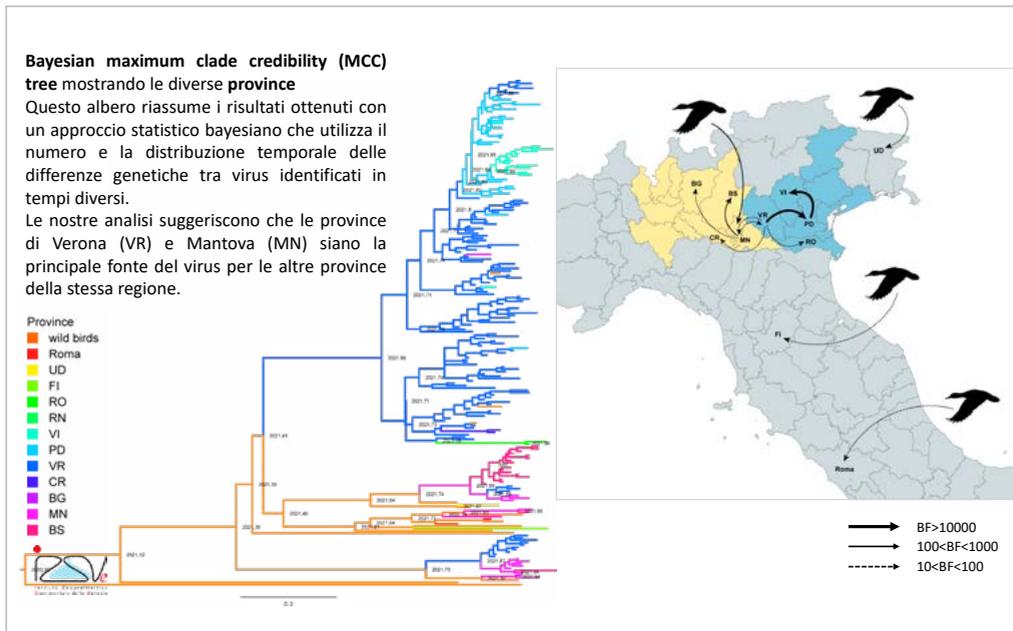
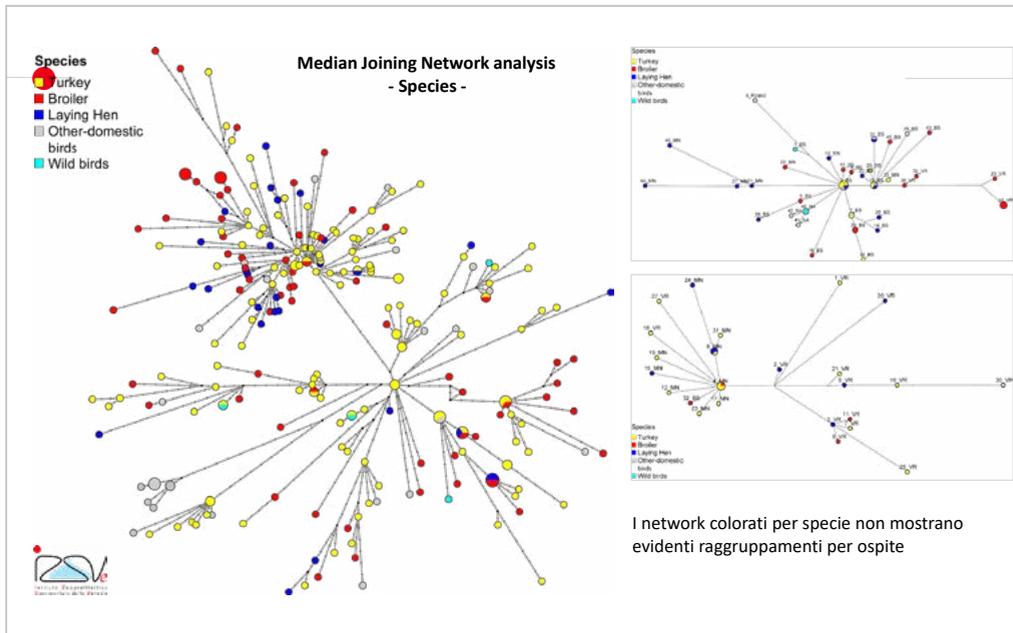
Tipo Contatto	Contatti registrati	Contatti 'produttivi'
Automezzo mangime	1297	38
Personale Filiera	85	2
Proprietario/Familiari	169	57
Prossimità (≤ 1500 m)	219	166
Totale	1770	263







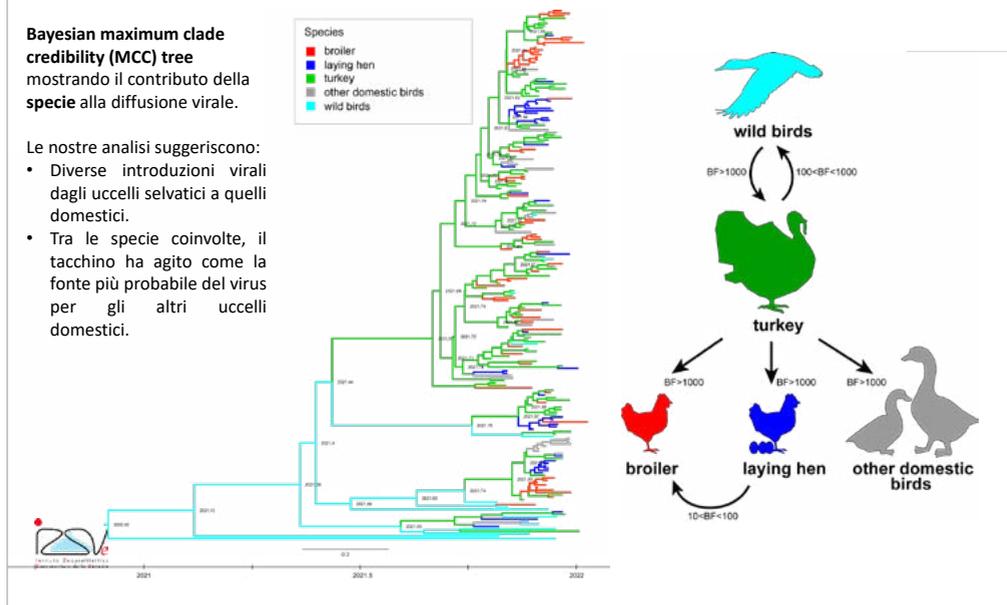




Bayesian maximum clade credibility (MCC) tree mostrando il contributo della specie alla diffusione virale.

Le nostre analisi suggeriscono:

- Diverse introduzioni virali dagli uccelli selvatici a quelli domestici.
- Tra le specie coinvolte, il tacchino ha agito come la fonte più probabile del virus per gli altri uccelli domestici.

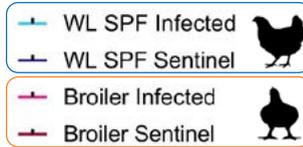
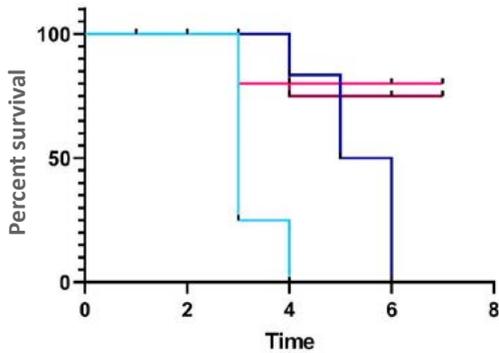


Qual è stato il ruolo esatto dei polli da carne in questa pandemia?

Le analisi genetiche che assegnano il ruolo di fondo cieco al broiler sono in linea con quanto osservato in campo e con le evidenze ottenute dalle infezioni sperimentali



Contact transmission

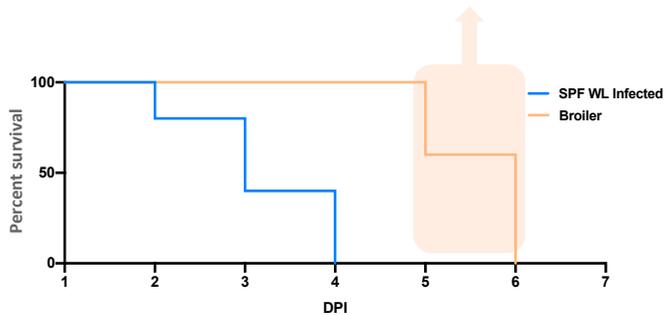


Tutti i polli di linea leggera (SPF) sono morti.
 Solo 1 su 4 broiler infettati è risultato positivo alla rRT-PCR ed è morto al giorno 3 p.i. La trasmissione è avvenuta solo in 1 sentinella/6. Nessuno dei broiler rimanenti è risultato virologicamente positivo fino a 14 giorni p.c. Shedding tracheale e cloacale dei broiler nettamente inferiore che negli SPF

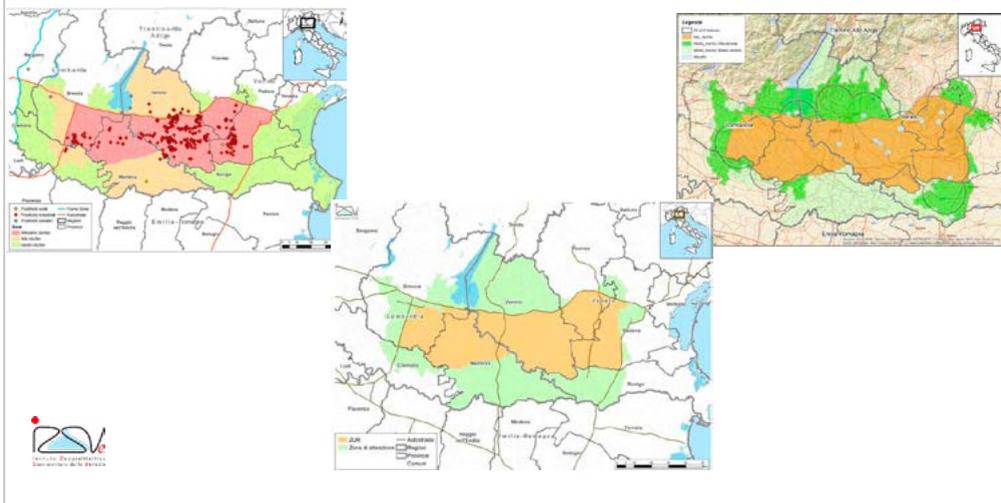
No sieroconversione negli animali sopravvissuti

Aerosol transmission

Tutti i broiler sono deceduti entro 6 giorni p.i. (sintomatologia evidente solo 12 ore prima della morte)



● Come si è arrivati all'eradicazione dell'epidemia - Istituzione di ampie zone di restrizione (ZUR)



● Come si è arrivati all'eradicazione dell'epidemia – depopolamento

Specie	Zona a Medio Rischio			Zona Attenzione		
	Autorizzabili al 29/03	Autorizzati al 29/03	% Autorizzati al 29/03 sul totale complessivo	Totale sbloccato da 01/04	% sbloccato da 01/04 sul totale complessivo	Totale complessivo
Broiler	209	163	60,15	108	39,85	271
Ovaiole	16	3	4,69	61	95,31	64
Ovaiole Pollastra	21	13	41,94	18	58,06	31
Riproduttori	44	3	5,00	57	95,00	60
Svezinatori	1			24	100,00	24
Tacchini da carne	119	85	50,30	84	49,70	169
Altro	17	8	14,29	48	85,71	56
Totale	427	275	40,74	400	59,26	675

● Come si è arrivati all'eradicazione dell'epidemia – depopolamento

Specie	Zona ad Alto Rischio		ZUR			Totale complessivo
	Autorizzati al 29/03	% Autorizzati al 29/03 sul totale complessivo	Totale accasabili dal 01/04	% accasabili dal 01/04	% NON accasabili dal 01/04	
Broiler	339	57,07	433	72,90	27,10	594
Ovaiole	16	11,35	134	95,04	4,96	141
Ovaiole Pollastra	23	38,98	55	93,22	6,78	59
Riproduttori	6	18,18	31	93,94	6,06	33
Svezinatori	3	13,64	2	9,09	90,91	22
Tacchini da carne	90	25,07	200	55,71	44,29	359
Altro	37	22,84	86	53,09	46,91	162
Totale	514	37,52	941	68,69	31,31	1370



● Come si è arrivati all'eradicazione dell'epidemia – monitoraggio straordinario

Allegato 5. Monitoraggio della malattia nella ZUR e nella Zona di attenzione

Numero di allevamenti di tacchini da carne, broiler, pollastra e ovaiole (nuova da consumo) da sottoporre a monitoraggio al fine di escludere una prevalenza di Influenza Aviaria, inter-allevamento, uguale o superiore al 3%, con un livello di confidenza (LC) del 95%.

Allevamenti accasabili per provincia	Allevamenti da campionare per provincia
≤ 50	100
51 - 65	51
66 - 80	57
81 - 100	63
101 - 140	70
141 - 200	78
201 - 250	81
251 - 344	85
345 - 584	90
≥ 585	100

Per ogni allevamento selezionato dovrà essere garantito il prelievo di almeno 20 tamponi tracheali da soggetti morti o sintomatici o disvitali. Il campionamento dovrà avvenire con la seguente cadenza:

- Ogni 7 giorni per gli allevamenti ricadenti nei comuni di cui all'Allegato 1, parte a) del presente dispositivo;
- Ogni 15 giorni per allevamenti ricadenti nei comuni di cui all'Allegato 1, parte b) del presente dispositivo.

Il campionamento dovrà essere eseguito su pollame che abbia raggiunto un'età di almeno:

- 28 giorni, per broiler e pollastre di galline ovaiole;
- 50 giorni, nel caso di tacchini da carne.

Negli allevamenti appartenenti alla categoria "svezinatori" il prelievo dei 20 tamponi tracheali deve essere eseguito su soggetti morti o malati di qualsiasi età almeno una volta alla settimana.



● **Principali criticità evidenziate**

- Inadeguatezza dei sistemi di abbattimento, depopolamento rapido e smaltimento materiale contaminato rispetto al numero di allevamenti presenti
- Ridotta efficacia delle misure di biosicurezza rispetto alla capacità di diffusione del virus e del livello di contaminazione ambientale
- Altissima diffusione «per contiguità» a causa dell'elevata concentrazione degli allevamenti avicoli e interconnessioni molto spinte tra i diversi allevamenti



● **Conclusioni**

- La recente epidemia di HPAI è stata la peggiore registrata in Europa fin ora
- La persistente circolazione di virus HPAI negli uccelli selvatici mette in serio pericolo la sostenibilità dell'avicoltura moderna
- E' necessario pensare a nuove efficaci strategie di prevenzione e controllo a partire da una migliore organizzazione del settore avicolo sul territorio nelle aree fortemente a rischio



● Ringraziamenti

Si ringraziano:

- Tutti i colleghi che hanno fornito dati per questa presentazione, in particolare i colleghi dei Laboratori della SCS4 - Epidemiologia Veterinaria dell'IZSve
- Tutti i colleghi che hanno lavorato per arrivare all'eradicazione dell'epidemia di HPAI dello scorso autunno-inverno, in particolare dei laboratori diagnostici dell'IZSve, dell'IZSLER, delle ASL, delle aziende e delle associazioni avicole
- Le Regioni coinvolte e il Ministero della Salute



Calogero (Lillo) Terregino

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Tel.: +39 049 8084377 – Mail: cterregino@izsvenezie.it

www.izsvenezie.it



PROPOSTE TECNICHE PER UNA GESTIONE EFFICACE DELLE FUTURE EPIDEMIE DA VIRUS INFLUENZALI IN ITALIA

Catania S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Proposte tecniche per una gestione efficace delle future epidemie da virus influenzali in Italia

Salvatore Catania



LXI Convegno Annuale SIPA
Rimini, 6 maggio, 2022

Programma

- Come è organizzata la presentazione
 - Il racconto di una storia
 - La genesi di un gruppo
 - Il percorso effettuato e le considerazioni fatte
 - La produzione del documento
- Considerazioni conclusive

Salvatore Catania, 6 maggio 2022



Il gruppo di Lavoro

- Alberto Dall'Angelo, Giuseppe Facchetti, Luigi Gavazzi, Leandro Giusti, Giovanni Ortali, Calogero Terregino, Giacomo Trevisani

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

3



Il racconto di una storia

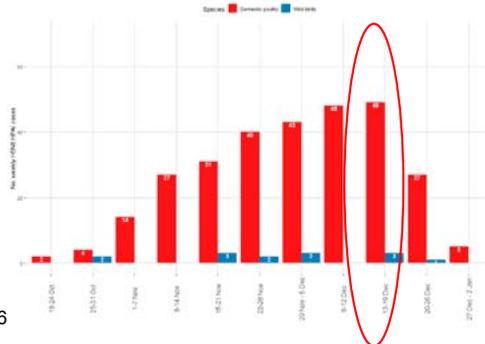
- Il tutto ha inizio nelle settimane precedenti il Natale del 21...

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

4

Il racconto di una storia

- Il tutto ha inizio nelle settimane precedenti il Natale del 21...
H5N1 HPAI – Numero di focolai/settimana



Salvatore Catania, 6

5

NUOVI TAMPONI POSITIVI GIORNALIERI

Italia - dati al 31 dicembre

Totale 6.125.68

Fonte: Ministero della Salute





Il racconto di una storia..... il perchè

- Abbiamo sentito la necessità di trovare un luogo in senso più ampio del termine, in cui si potesse parlare di AI dal punto di vista tecnico
- Era necessario individuare un limitato numero di colleghi rappresentativi delle varie realtà per poter commentare/condividere

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

7



Il racconto di una storia..... il come

- Classico gruppo WUP con variante Padano/Sicula Nord a Sud il sistema è collaudato

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

8

Il racconto di una storia..... il come

- Classico gruppo WUP con variante Padano/Sicula Nord a Sud il sistema è collaudato



Salvatore Catania, 6 maggio 2022

9

Materiali e metodi

- Incontri settimanali
- Definizione di macrocategorie di argomenti
- Definizione delle sottocategorie
- Definizione delle priorità
- Processo collegiale di valutazione e verifica sulla base delle recenti evidenze
- Sintesi delle attività fatte

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

10

Le macro categorie individuate

1. Organizzazione e disegno del territorio (sottocapitoli priorità 2,3,4)
2. Implementazione sistemi early detection (Priorità 1)
3. Vaccinazione (Priorità 6)
4. Necessità per le future epidemie (Priorità 5)
5. Compartimentazione e gestione delle aree
6. Uova da incubare...operatività degli incubatoi nelle aree soggette a restrizione (da fare in tempo di pace)
7. Regole di smaltimento cat 2 e cat 3 in fase emergenziale
8. Disinfezione camion e indicazioni su rientro camion da macello

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

11

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

12

Le macro categorie individuate

1. Organizzazione e disegno del territorio (sottocapitoli priorità 2,3,4)
2. Implementazione sistemi early detection (Priorità 1)
3. Vaccinazione (Priorità 6)
4. Necessità per le future epidemie (Priorità 5)
5. Compartimentazione e gestione delle aree
6. Uova da incubare....operatività degli incubatoi nelle aree soggette a restrizione (da fare in tempo di pace)
7. Regole di smaltimento cat 2 e cat 3 in fase emergenziale
8. Disinfezione camion e indicazioni su rientro camion da macello

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

13

Implementazione sistemi early detection (Priorità 1)

- a) Valutazione oggettiva dei riscontri clinici rilevati nelle varie specie e categorie e definizione di criteri di allerta
- b) Per le categorie (ad es. broiler) in cui clinicamente risulta poco chiaro formulare un sospetto valutare un sistema di monitoraggio realisticamente applicabile e finalizzato ad anticipare l'evidenza di positività

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

14

● a) Valutazione oggettiva dei riscontri clinici rilevati nelle varie specie e categorie e definizione di criteri di allerta

- i. **Tacchino:** rialzo mortalità >0.2% nel capannone e naturalmente, inappetenza, gruppo fermo, non chiude animali a terra. I morti solitamente sono concentrati in una area limitata.
- ii. **Gallina ovaioia e fase pollastra** rialzo sospetto e repentino mortalità, 2/3 volte il giorno precedente nel capannone e naturalmente, inappetenza, gruppo fermo, non chiude animali a terra. I morti solitamente sono concentrati in una area limitata e se in gabbia in prossimità delle ventole.
- iii. **Broiler** assenza di sintomatologia netta e mancanza di rialzi sospetti, si preferisce focalizzare l'attenzione in sistemi di monitoraggio settimanale anche in corso di mortalità "fisiologica"
- iv. **Faraona** Rialzo sospetto e repentino mortalità, 2/3 volte il giorno precedente
- v. **Altre specie**, come in precedenza controllare i parametri produttivi e le variazioni di mortalità

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

15

● Implementazione sistemi early detection (Priorità 1)

- a) Valutazione oggettiva dei riscontri clinici rilevati nelle varie specie e categorie e definizione di criteri di allerta
- b) Per le categorie (ad es. broiler) in cui clinicamente risulta poco chiaro formulare un sospetto valutare un sistema di monitoraggio realisticamente applicabile e finalizzato ad anticipare l'evidenza di positività

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

16

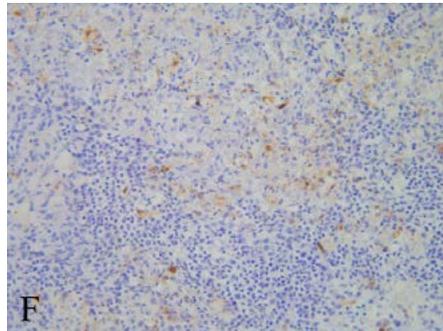
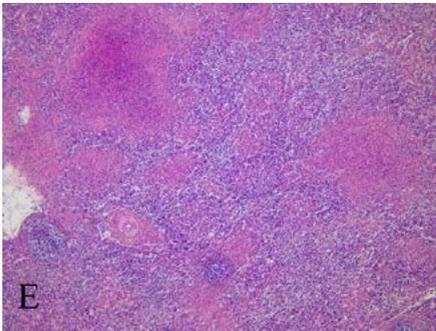
● b) Per le categorie (ad es. broiler) in cui clinicamente risulta poco chiaro formulare un sospetto valutare un sistema di monitoraggio realisticamente applicabile e finalizzato ad anticipare l'evidenza di positività

- i. Monitoraggio settimanale sui morti per capannone in animali di età superiore a 4 settimane numero di animali morti da campionare i morti della giornata fino ad un massimo di 20, focalizzandosi sui capannoni che mostrano un % di mortalità superiore. (Valutare le potenzialità di laboratori privati) RO, VE, Bassa Padovana, Bergamo (Zona Verde)
- ii. naturalmente in tutti i casi di rialzi anomali di mortalità in animali di età superiore alle 2 settimane produrre un sospetto
- iii. valutazione di eventuali altri sistemi di campionamento (attività future)

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

17

● ... ne approfittiamo



•SPLEEN: severe, multifocal to coalescing necrosis with heterophilic infiltration. Multifocal reactive follicles. 10X HPF

•SPLEEN: ++ IHC, 40X

Foto Claudia Zanardello IZSve

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

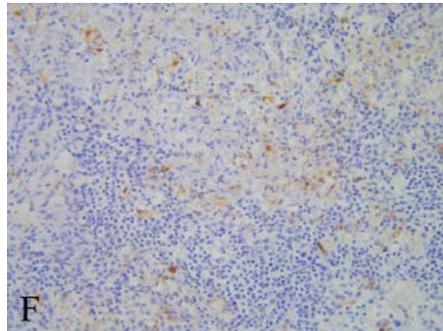
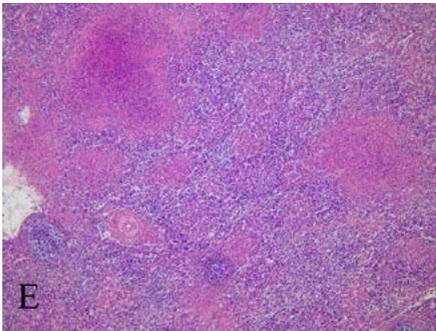
... ne approfittiamo



Salvatore Catania, 6 maggio 2022

18

... ne approfittiamo



- SPLEEN: severe, multifocal to coalescing necrosis with heterophilic infiltration. Multifocal reactive follicles. 10X HPF
- SPLEEN: ++ IHC, 40X

Foto Claudia Zanardello IZSve

Salvatore Catania, 6 maggio 2022



Salvatore Catania, 6 maggio 2022

20

Organizzazione e disegno del territorio

- a) Attività volte alla riduzione del rischio di introduzione (Priorità 3)
- b) Allevamenti con carenze di biosicurezza importanti segnalate dai colleghi della filiera per avere una visita ispettiva in breve tempo. Sarebbe opportuno elevare il rango dell'ordinanza Storace oppure definire qualcosa a livello regionale.
- c) Verona Vicenza Padova sotto A4 sarebbe opportuno trasformarla in area B per controllare meglio la tipologia dei nuovi insediamenti
- d) Nelle aree particolarmente complesse e dense come Verona quali potrebbero essere le proposte di miglioramenti del territorio o almeno di non peggioramento di questo
- e) Attività volte alla riduzione del rischio di diffusione (Priorità 2)

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

21

● e) **Attività volte alla riduzione del rischio di diffusione**

- i. Rapidità di risposta nel risolvere il focolaio
- ii. Strategie di depopolamento rapido realisticamente applicabili
- iii. Capacità potenziali di svuotamento per distretto di competenza
- iv. Sistemi di abbattimento consentiti e considerati efficaci alla luce dell'ultima esperienza
- v. Possibili e potenziali nuove proposte tecnico operative

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

22

● i. **Rapidità di risposta nel risolvere il focolaio**

- 1) Depolamento centripeto dell'area di protezione
- 2) Gruppo infetto abbattuto il prima possibile ma le carcasse non spostate fino al vuoto
- 3) Tempistiche di depopolamento funzionali e realistiche

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

23

ii. Strategie di depopolamento rapido realisticamente applicabili

1. Supervisione della gestione degli abbattimenti dei focolai. Istituzione di una task force di intervento costituita da vet pubblici, vet di filera preparati a tale scopo squadre formate per le operazioni, almeno 5 disponibili per la regione Veneto e altrettante in regione Lombardia, definire rendering e capacità di raccolta e trasformazione, con la stipula di contratti a livello interregionale almeno per le 3 regioni più esposte.
2. Formazione delle imprese sfruttando le esperienze di questa epidemia (formatori olandesi)
3. Favorire abbattimenti preventivi in modo da ridurre l'eliminazione virale nell'area e conseguentemente evitare di dover gestire grandi quantità di materiale contaminato
4. Decrementare la densità dell'area colpita (macellazioni mirate, Cosa? Come? Quando? ed in che modalità?)

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

24

Il processo di sintesi e la produzione di un documento



Torna, 7 febbraio 2020
Rit. 3-1-100

MEMO ALLA DGGAF

Dir. Federico Luchini

Al Direttore dell'Ufficio DGGAF

Dir. Luca Riva

Allo DGGAF/IN

Dir. Luca Riva

Al Direttore OMSA

Dir. Caterina Tomaglio

Al Direttore dell'Ufficio Venezia/Bologna

Dir. Michela Scricciolo

Al Direttore dell'Ufficio Venezia/Bologna

Dir. Marco Falci

Spett.le,

in seguito alla epidemia di influenza aviaria dell'Atto paragrafo 10, che ha stimolato un'area operativa strategica per il settore avicolo italiano, compromettendone per almeno mesi il grado di autosufficienza e, di fatto, in forte dipendenza dalle importazioni, si è costituito un gruppo di lavoro di esperti di settore con il supporto di alcuni esperti del CSIS.

Il gruppo, che si è riunito settimanalmente per dare vita ad una efficace cartella, ha prodotto delle proposte orientate nei confronti di aspetti strategici e che hanno permesso con l'impiego di risorse in contropartita, che il programma possa essere realizzato, funzionante.

Con l'occasione si ringrazia per la collaborazione.

Distinta

Il Direttore
Luca Riva

Assenti

Il Direttore
Stefano Gagliardi

Stefano Gagliardi

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

25

● Il processo di sintesi e la produzione di un documento



Roma, 1° febbraio 2022
Prot. 5 - 2022

Roma, 1° febbraio 2022
Prot. 5 - 2022

Al DG della DGSAF
Dott. Pierdavide Lecchini

Al Direttore dell'Ufficio 3 DGSAF
Dott. Luigi Ruocco

Alla DG dell'IZSVe
Dott.ssa Antonia Ricci

Al Direttore CRNA
Dott. Calogero Terregino

Al Direttore dell'U.O. Veterinaria Regione
Veneto
Dott. Michele Brichese

Al Direttore dell'U.O. Veterinaria Regione
Lombardia
Dott. Marco Fioroli

Egregi,

a seguito della epidemia di influenza aviaria ad alta patogenicità, che ha interessato un'area produttiva strategica per il settore avicolo italiano, compromettendone per i prossimi mesi il grado di autosufficienza e arrivando a mettere in forse la sopravvivenza delle piccole aziende, si è costituito un gruppo di lavoro di esperti di campo, con il supporto di alcuni veterinari dell'IZSVe.

Il gruppo, che si è riunito settimanalmente per dare vita ad una riflessione comune, ha prodotto delle proposte sintetizzate nel documento di seguito allegato e che trasmettiamo con l'intento di fornire un contributo, che ci auguriamo possa essere valutato favorevolmente.

Con l'occasione, si inviano i migliori saluti.

UnaItalia

Il Direttore
Lara Sant'Antonio
Lara Sant'Antonio

ASSOVAI

Il Direttore
Stefano Gagliardi

Stefano Gagliardi

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

26

● Il processo di sintesi e la produzione di un documento

- [I contenuti](#)

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

27



Ministero della Salute

DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' SOCIALE E DELL'AGRICOLTURA
DIREZIONE 3

Strumenti tecnici e politiche operative del Centro nazionale di riferimento per le malattie animali e zoonosi correlate di origine

• Monitoraggio broiler in autocontrollo

Oggetto: Influenza aviaria ad alta patogenicità H5N1 – Dispositivo dirigenziale recante ulteriori misure di controllo e sorveglianza per prevenire l'introduzione e contenere la diffusione dell'influenza aviaria.

IL DIRETTORE GENERALE

Allegato 4. Criteri per l'identificazione di casi sospetti di HPAI nelle diverse categorie produttive (a partire dalla seconda settimana di vita)

Sulla base della valutazione oggettiva dei riscontri clinici rilevanti durante la recente epidemia di HPAI e tenuti i veterinari operanti nel settore al decimo di rivedere i criteri di allerta per l'emissione di un sospetto su base clinica.

- **Turchino.** Uno o più dei seguenti sintomi: rialzo mortalità giornaliera > 0,2% nel singolo capannone (morti solitamente concentrati in una area limitata), inappetenza, gruppo fermo con animali a terra.
- **Gallina ovaiole** inclusa la fase pollastra. Uno o più dei seguenti sintomi: rialzo sospetto e repentino mortalità, 2-3 volte superiore al numero dei capi deceduti il giorno precedente nel singolo capannone (morti solitamente sono concentrati in una area limitata e se in pubblica in prossimità delle ventole), calo produzione di uova, inappetenza, gruppo fermo, animali a terra.
- **Broiler.** La recente epidemia ha mostrato nella maggior parte dei casi assenza di sintomatologia sospetta e mancanza di significativa mortalità, e necessario quindi impostare sistema di monitoraggio precoce anche in caso di mortalità "atipica" (vedi allegato 5). Nonostante il sospetto dovrà essere avanzato in casi di rialzo anomalo di mortalità e evidenze anomale di comportamento e cali di produzione.
- **Faraona.** Rialzo sospetto e repentino di mortalità, 2-3 volte superiore al numero dei capi deceduti il giorno precedente nel singolo capannone.
- **Altre specie.** Alterazione dei parametri produttivi, anomale di comportamento e variazioni di mortalità rispetto alla norma.

Salvatore Catania, 6 maggio 2022



Conclusioni

31.3.2016



Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 84/1

I

(Atti legislativi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) 2016/429 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO

del 9 marzo 2016

relativo alle malattie animali trasmissibili e che modifica e abroga taluni atti in materia di sanità animale («normativa in materia di sanità animale»)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

29



Take home message

- ... andrei ad un considerando

(51) Una gestione ottimale della sanità animale può essere conseguita soltanto in cooperazione con i detentori di animali, gli operatori, i veterinari, i professionisti della sanità animale, le altre parti interessate e i partner commerciali. Per garantirsi il loro sostegno, è necessario organizzare le procedure decisionali e l'applicazione delle misure di cui al presente regolamento in modo chiaro, trasparente e inclusivo.

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

30



Take home message

- I Medici Veterinari devono costantemente investire energie nel costruire e mantenere un network in cui tutti gli attori partecipano proattivamente al raggiungimento dell'obiettivo comune, che risulta essere una «**Produzione sostenibile con elevati standard qualitativi**»

(51) Una gestione ottimale della sanità animale può essere conseguita soltanto in cooperazione con i detentori di animali, gli operatori, i veterinari, i professionisti della sanità animale, le altre parti interessate e i partner commerciali. Per garantirsi il loro sostegno, è necessario organizzare le procedure decisionali e l'applicazione delle misure di cui al presente regolamento in modo chiaro, trasparente e inclusivo.

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

31

Ringraziamenti

- Alberto Dall'Angelo, Giuseppe Facchetti, Luigi Gavazzi, Leandro Giusti, Giovanni Ortali, Calogero Terregino, Giacomo Trevisani... ed i tanti colleghi che durante l'epidemia hanno dato il 110% avendo sempre il tempo di fare 2 parole sulla situazione in tempo reale
- Rossella Pedicone
- Unaitalia e Assoavi

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

32

Grazie per l'attenzione



*Se vuoi andare veloce
cammina da solo
Se vuoi andare lontano
cammina con le altre
persone
(Proverbio africano)*

Salvatore Catania, 6 maggio 2022

33



ATTI DEL VII SIMPOSIO SCIENTIFICO

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Forlì (FC), 28 Ottobre 2022

MISCELE MICROINCAPSULATE DI SOSTANZE AROMATIZZANTI E ACIDI ORGANICI COME SUPPLEMENTI ALIMENTARI PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE NECROTICA DA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN POLLI DA CARNE

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

¹ Vetagro S.p.A., via Porro, 2 – 42124 – Reggio Emilia (Italy);

² DIMEVET, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO), Italy;

³ Vetagro, Inc., 17 E. Monroe St., Suite #179, 60604 Chicago (IL), USA

Summary

Necrotic enteritis (NE) is one of the most common diseases in poultry production worldwide, leading to sub-optimal performance and considerable economic losses. Botanicals are progressively gaining importance as feed additives for their biological properties among which antibacterial and anticoccidial, while organic acids are well-known antimicrobials. The aim of this study was to reproduce a NE challenge model caused by *Eimeria* coccidia and *Clostridium perfringens* (CP) in broilers and evaluate the effects of microencapsulated blends of botanicals and organic acids in comparison with conventional drug treatments.

A total of 2,500 day-old chicks (Cobb 500) were vaccinated for coccidiosis with Coccivac®-B52, divided in pens (50 birds/pen) and assigned to 5 groups (10 pens/group): CTR group, fed a control diet; AMP group, fed a diet with 100 ppm of Amprolium; BMD group, fed a diet with 55 ppm of bacitracin; TRT1, fed a diet supplemented with 400 g/MT of Prototype 1; TRT2, fed a diet supplemented with Prototype 1 at 400 g/MT and Prototype 2 at 500 g/MT. Prototype 1 and Prototype 2 are a two microencapsulated blends of botanicals and organic acids (Prototype 1) and only botanicals (Prototype 2) manufactured by Vetagro. All the animals were challenged first with cocci through an oral inoculation with *E. maxima* (5,000 oocysts) at day 14, then with CP (alpha toxin and netB toxin positive, 10⁸ CFU) orally administered for 3 days (d19, 20, and 21). The study lasted 42 days with small intestine lesions scored at d21 from 3 birds/pen, fecal oocysts counted at day 28 and growth performance recorded throughout the study. Data were analyzed with ANOVA and differences considered significant at P<0.05.

No differences in growth performance were observed before the challenge. From d14 to d28, immediately after the challenge, all the treated groups showed improved growth with higher weight gains and lower feed conversion ratio values compared to CTR group (P<0.01). Overall (0-42 days), the group TRT2 had the highest weight gain although only numerically (P=0.17), while FCR values were significantly reduced in particular by TRT2 and BMD (1.68 both) followed by TRT1 and AMP (1.73 both) compared to CTR group (1.84). All the treatments reduced overall mortality and mortality due to NE compared to CTR (P<0.0001). Compared to CTR, small intestine lesions score was reduced particularly by AMP and TRT2, while *E. maxima* counts were significantly lower only in TRT2 group (P<0.01).

To conclude, the microencapsulated blends of botanicals and organic acids used in this study have the potential to contain loss of performance and lesions associated with NE challenge in broiler chickens to the same extent of conventional drugs.

INTRODUZIONE

L'enterite necrotica (EN) è ritenuta una delle principali minacce per l'industria avicola globale, con ingenti perdite economiche. Si tratta di una patologia intestinale causata dalla proliferazione di ceppi tossigenici del batterio Gram-positivo, anaerobio, sporigeno *Clostridium perfringens* e che vede nella coccidiosi e in particolare nel danno alla mucosa intestinale causato da *Eimeria* spp. il principale fattore predisponente (Paiva & McElroy, 2014; Quiroz-Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015; Timbermont et al., 2011). L'EN nella sua forma clinica acuta causa severe lesioni intestinali e alti tassi di mortalità, mentre nella sua forma sub-clinica riduce le performance di crescita degli animali (Van Immerseel et al., 2004). Le restrizioni di tipo legislativo e la crescente diffusione di sistemi di produzione senza l'uso di antibiotici hanno portato da un lato ad un aumento dell'incidenza dell'EN e dall'altro ad un accresciuto l'interesse verso la ricerca di strategie alternative per controllare il problema (Van Immerseel et al., 2016). Gli acidi organici sono ampiamente utilizzati come antimicrobici alternativi agli antibiotici convenzionali, mentre i composti vegetali e i prodotti derivati da piante, collettivamente definiti fitogenici, trovano sempre più ampio utilizzo nella nutrizione animale date le loro molteplici proprietà biologiche, quali antibatteriche, anticoccidiche, anti-infiammatorie e anti-ossidanti (Giovagnoni et al., 2019; Rossi et al., 2020; Felici et al., 2020).

L'obiettivo di questo studio è stato riprodurre nei polli da carne un modello di enterite necrotica causata da coccidi di *Eimeria* e *Clostridium perfringens* e valutare l'effetto di due miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici a confronto con trattamenti farmacologici convenzionali.

MATERIALI E METODI

Un totale di 2500 polli da carne maschi (Cobb 500) al giorno 0 di vita sono stati vaccinati per coccidiosi (Coccivac®-B52), allocati in box (50 animali/box) e assegnati a 5 gruppi sperimentali (10 box/gruppo):

- 1) Gruppo CTR, alimentato con una dieta standard;
- 2) Gruppo AMP, alimentato con una dieta standard supplementata con 100 ppm di Amprolium;
- 3) Gruppo BMD, alimentato con una dieta standard supplementata con 55 ppm di Bacitracina
- 4) Gruppo TRT1, alimentato con una dieta standard supplementata con Prototipo 1 a 400 g/ton;
- 5) Gruppo TRT2, alimentato con una dieta standard supplementata con Prototipo 1 a 400 g/ton e Prototipo 2 a 500 g/ton.

Le diete sono state fornite *ad libitum* a partire dall'accasamento secondo questo piano alimentare: fase starter (giorno 0-14), fase grower (giorno 14-28), fase finisher (giorno 28-36), fase withdrawal (giorno 36-42). Le diete consistevano in mangimi commerciali, non medicati, formulati sulla base delle indicazioni

NRC e fornite come pellet sbriciolato (starter) o come pellet (grower, finisher e withdrawal). Prototipo 1 e Prototipo 2 sono due miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici (Prototipo 1) o solo sostanze aromatizzanti (Prototipo 2) prodotte da Vetagro S.p.A.

Tutti gli animali in prova sono stati sottoposti ad un challenge per indurre enterite necrotica attraverso la somministrazione orale di *E. maxima* (5000 oocisti/animale) al giorno 14 seguita dalla somministrazione orale di *C. perfringens* (ceppo di campo alpha toxin e netB toxin positivo, 10^8 CFU) per 3 giorni consecutivi, giorno 19, 20 e 21. Al giorno 21, 3 animali/box sono stati sacrificati ed esaminati per le lesioni intestinali da enterite necrotica secondo un metodo di score da 0 a 3 di gravità crescente con punteggio 0 per intestino normale, 1 per intestino con perdita di tono e lieve strato di muco, 2 per intestino con severa enterite necrotizzante e 3 per intestino con estrema enterite necrotizzante e presenza di sangue nel lume (Hofacre et al., 1998). Al giorno 28 sono stati raccolti campioni fecali da ogni box per la conta del numero di oocisti per grammo (OPG) di feci mediante metodica Mc Master al fine di determinare l'eliminazione fecale di *E. acervulina*, *E. maxima* ed *E. tenella*.

I box sono stati monitorati quotidianamente per controllare eventuali animali morti oppure da abbattere, di cui è stato registrato il peso e la causa di morte attraverso esame necroscopico. Per determinare le performance di crescita, sono stati registrati l'alimento somministrato e il peso vivo per box ai giorni 0, 24, 28, 36 e 42. Conseguentemente sono stati calcolati parametri di crescita quali l'ingestione alimentare, l'incremento ponderale e l'indice di conversione alimentare aggiustato sulla base della mortalità.

I dati sono stati analizzati con ANOVA seguita da test di Tukey (Graph Pad Prism 6; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.05$ e le tendenze per $0.05 < P \leq 0.10$.

RISULTATI

Performance di crescita

I risultati delle performance di crescita sono riportati nella Tabella 1. Nel periodo 0-14 giorni, prima dell'infezione con *E. maxima* e *C. perfringens*, non sono state osservate differenze nei parametri di crescita dei gruppi. Dal giorno 14 al giorno 28, durante ed immediatamente dopo il challenge, tutti i gruppi trattati hanno mostrato una crescita migliore con valori di accrescimento ponderale più alti (in media +95 g / animale) e indici di conversione più bassi (in media -0.15) rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.01$). Anche nel periodo 28-36 giorni è stata osservata una tendenza a ridotti indici di conversione rispetto al controllo per i gruppi BMD, TRT1 e TRT2 ($P = 0.10$). Complessivamente (giorni 0-42), il gruppo TRT2 ha mostrato il più alto accrescimento ponderale rispetto al gruppo CTR (+129 g/animale) seppur solo numericamente ($P = 0.17$), mentre gli indici di conversione sono stati ridotti rispetto al controllo in particolare nei gruppi TRT2 e BMD (-0.16 entrambi) seguiti dai gruppi TRT1 e AMP (-0.11 entrambi).

Mortalità, lesioni intestinali ed eliminazione fecale di Eimeria

In Tabella 2 sono presentati i risultati della mortalità, delle lesioni intestinali e dell'eliminazione fecale di *Eimeria*. Tutti i trattamenti hanno ridotto

significativamente la mortalità totale rispetto al controllo ($P < 0.0001$), mentre il tasso di mortalità da enterite necrotica è stato ridotto soprattutto da TRT2, TRT1 e BMD ma solo parzialmente da AMP ($P < 0.0001$). Rispetto al gruppo CTR, le lesioni intestinali da enterite necrotica sono state ridotte in particolare nei gruppi AMP e TRT2, mentre i gruppi BMD e TRT1 hanno mostrato valori intermedi ($P = 0.003$). Per quanto riguarda l'eliminazione di *Eimeria* nelle feci, non sono state rilevate oocisti di *E. acervulina* ed *E. tenella* in nessun campione. I livelli di *E. maxima* sono stati ridotti significativamente rispetto al controllo soltanto nel gruppo TRT2 ($P < 0.01$).

DISCUSSIONE

Questo studio si prefiggeva l'obiettivo di valutare l'effetto di miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti a confronto con trattamenti farmacologici convenzionali *in vivo* in un modello di enterite necrotica. Al fine di riprodurre una condizione tipica della realtà di campo caratterizzata da coccidiosi come fattore predisponente la proliferazione di *C. perfringens*, gli animali sono stati sottoposti a vaccinazione per coccidiosi con un vaccino multi-specie (Coccivac®-B52) al giorno 0, successivamente infettati con una singola dose di *E. maxima* al giorno 14 e infine sottoposti ad infezione *C. perfringens* per 3 giorni consecutivi 19, 20 e 21. È stato utilizzato un ceppo di campo di *C. perfringens* di tipo G (alpha toxin e netB toxin positivo) ossia uno dei tossino-tipi di *C. perfringens*, assieme al tipo A e al tipo C, maggiormente di interesse per l'industria avicola in quanto associati alle principali patologie enteriche (Abd El-Hack et al., 2022). Tutti gli animali in prova sono stati sottoposti al challenge in modo da simulare un focolaio di enterite necrotica attorno alla seconda-terza settimana di crescita e valutare l'eventuale effetto protettivo di trattamenti alimentari somministrati in continuo nella dieta dall'inizio alla fine del ciclo. Come trattamenti farmacologici convenzionali sono stati testati Bacitracina e Amprolium, ossia rispettivamente un antibiotico anti-clostridico e un chimico anti-coccidico. Tutti i trattamenti alimentari, sia i farmaci sia i prodotti incapsulati a base di sostanze aromatizzanti e acidi organici, hanno permesso di migliorare le performance di crescita rispetto al controllo in particolare durante il challenge e nel periodo immediatamente successivo al challenge. Questo effetto protettivo sulla crescita degli animali è stato mantenuto anche alla fine della prova al giorno 42 e complessivamente durante tutto il ciclo, quando i migliori valori di indice di conversione sono stati osservati con la combinazione di prodotti incapsulati in modo analogo a Bacitracina. Questo risultato macroscopico può essere spiegato dall'azione benefica dei trattamenti a livello intestinale, come indicato dalle ridotte lesioni intestinali da *C. perfringens* e dalla conseguente ridotta mortalità da enterite necrotica. Inoltre, i prodotti incapsulati, in particolare la loro combinazione, sono stati gli unici a ridurre anche l'eliminazione fecale di *E. maxima*, a conferma dell'azione anticoccidica di queste miscele vegetali già dimostrata in precedenti studi *in vitro* e *in vivo* (Felici et al., 2020, Tugnoli et al., 2021).

CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che in un modello di enterite necrotica di polli da carne causata da *Eimeria* e *Clostridium perfringens* l'integrazione alimentare

con miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici può migliorare le performance di crescita e ridurre le lesioni intestinali in modo analogo a trattamenti farmacologici convenzionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, El-Shall NA, Saad AM, Salem HM, El-Tahan AM, Khafaga F, Taha AE, AbuQamar SF and KA El-Tarabily. (2022). Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. *Poult Sci.* 101: 101590.
2. Felici M, Tugnoli B, Ghiselli F, Massi P, Tosi G, Fiorentini L, Piva A and E Grilli. (2020). Attività anticoccidica in vitro di estratti vegetali. V Simposio Scientifico Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA), Novembre 19, 2020 – virtuale.
3. Felici M, Tugnoli B, Piva A and E Grilli. (2021). In Vitro Assessment of Anticoccidials: Methods and Molecules. *Animals* 11: 1962-1981.
4. Giovagnoni G, Tugnoli B, Piva A and E. Grilli (2019). Organic Acids and Nature Identical Compounds Can Increase the Activity of Conventional Antibiotics Against *Clostridium Perfringens* and *Enterococcus Cecorum* In Vitro. *J Appl Poult Res.* 28: 1398-407.
5. Hofacre CL, Froyman R, Gautrias B, Georgie B, Goodwin MA, and J Brown. (1998). Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 42: 579-584.
6. Quiroz-Castaneda RE and E Dantan-Gonzalez. (2015). Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 430610, 11 pages.
7. Rossi B, Toschi A, Piva A and E. Grilli. (2020). Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutr Res Rev.* 10: 1-17.
8. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R and F Van Immerseel. (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40(4): 341-347.
9. Tugnoli B, Piva A and E Grilli. (2021). Una miscela microincapsulata di molecole vegetali in un modello di coccidiosi in polli da carne. VI Simposio Scientifico Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA), Novembre 19, 2021 – Bologna, Italy.
10. Van Immerseel F, de Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F and R Ducatelle. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33: 537-549.
11. Van Immerseel F, Lhys U, Pedersen K and JF Prescott. (2016). Editorial: Recent breakthroughs have unveiled the many knowledge gaps in *Clostridium perfringens*-associated necrotic enteritis in chickens: The First International Conference on Necrotic Enteritis in Poultry. *Avian Pathol.* 45: 269-270.

Tabella 1 - Performance di crescita

	Gruppo CTR	Gruppo AMP	Gruppo BMD	Gruppo TRT1	Gruppo TRT2	P
Fase: giorno 0-14						
Ingestione di alimento (kg/box)	15.60	16.82	16.13	15.79	16.02	0.15
Incremento ponderale (kg/capo)	0.275	0.302	0.289	0.284	0.283	0.19
ICA*	1.143	1.127	1.134	1.132	1.137	0.93
Fase: giorno 14-28						
Ingestione di alimento (kg/box)	66.01	68.30	64.33	66.27	66.53	0.25
Incremento ponderale (kg/capo)	0.864 ^a	0.955 ^b	0.954 ^b	0.957 ^b	0.965 ^b	0.002
ICA*	1.637 ^a	1.545 ^b	1.451 ^c	1.472 ^c	1.457 ^c	<0.0001
Fase: giorno 28-36						
Ingestione di alimento (kg/box)	63.53	61.82	62.54	62.77	62.90	0.82
Incremento ponderale (kg/capo)	0.574	0.571	0.609	0.569	0.590	0.73
ICA*	2.582	2.452	2.287	2.348	2.340	0.10
Fase: giorno 36-42						
Ingestione di alimento (kg/box)	46.42	45.40	45.47	46.28	48.64	0.13
Incremento ponderale (kg/capo)	0.592	0.558	0.554	0.543	0.597	0.42
ICA*	1.819	1.816	1.813	1.892	1.782	0.41
Totale: giorno 0-42						
Ingestione di alimento (kg/box)	191.56	192.33	188.46	191.10	194.08	0.69
Incremento ponderale (kg/capo)	2.305	2.386	2.407	2.351	2.434	0.17
ICA*	1.843 ^a	1.729 ^b	1.679 ^b	1.732 ^b	1.679 ^b	<0.0001

CTR = dieta standard; AMP = dieta standard + Amprolium a 100 ppm; BMD = dieta standard + Bacitracina a 55 ppm; TRT1 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton; TRT2 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton + Prototipo 2 a 500 g/ton.

* Indice di Conversione Alimentare, aggiustato sulla base della mortalità.

^{abc} Per ciascun parametro lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Tabella 2 – Mortalità, lesioni intestinali ed eliminazione fecale di *Eimeria*

	Gruppo CTR	Gruppo AMP	Gruppo BMD	Gruppo TRT1	Gruppo TRT2	P
Mortalità						
totale (%)	7.45 ^a	4.26 ^b	3.64 ^b	3.41 ^b	1.91 ^b	<0.0001
da enterite necrotica (%)	3.6 ^a	1.6 ^{ab}	0.2 ^{bc}	0.4 ^{bc}	0 ^c	<0.0001
Lesioni enterite necrotica (*)	0.63 ^a	0.13 ^b	0.33 ^{ab}	0.30 ^{ab}	0.27 ^b	0.003
Oocisti per grammo (OPG) di feci						
<i>E. acervulina</i>	0	0	0	0	0	-
<i>E. maxima</i>	13755 ^a	10083 ^a	18995 ^a	6459 ^{ab}	4221 ^b	0.0004
<i>E. tenella</i>	0	0	0	0	0	-

CTR = dieta standard; AMP = dieta standard + Amprolium a 100 ppm; BMD = dieta standard + Bacitracina a 55 ppm; TRT1 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton; TRT2 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton + Prototipo 2 a 500 g/ton.

^{abc} Per ciascun parametro lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

* Score lesioni da 0 a 3 (punteggio 0 per intestino normale, 1 per intestino con perdita di tono e lieve strato di muco, 2 per intestino con severa enterite necrotizzante e 3 per intestino con estrema enterite necrotizzante e presenza di sangue nel lume).

EFFETTO DI UNA MISCELA DI SOSTANZE AROMATIZZANTI E ACIDI ORGANICI CONTRO *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN-VITRO

Ghiselli F.¹, Giovagnoni G.¹, Felici M.¹, Tugnoli B.², Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{1,3}

¹ DIMEVET – Via Tolara di Sopra, 43, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO)
Università degli studi di Bologna (BO), Italia;

² Vetagro S.p.A. - Via Ignazio Porro, 2, 42124 Reggio Emilia (RE), Italia;

³ Vetagro, Inc. - 116 W. Jackson Blvd., Suite #320, 60604 Chicago (IL), USA

Summary

Necrotic enteritis causes economic losses estimated to be up to 6 billion US dollars per year. Clinical and sub-clinical infections in poultry are also both correlated with decreased growth and feed efficiency. Moreover, in a context of increased antibiotic resistance, feed additives with enhanced antimicrobial properties are a useful and increasingly needed strategy. In this study, the protective effects of a blend of thymol and organic acids against the effects of *Clostridium perfringens* type A (CP) on chicken intestinal epithelial cells were investigated and compared to bacitracin, a widely used antibiotic in poultry production. Primary chicken intestinal epithelial cells were challenged with CP for a total time of 3h to assess the beneficial effect of two doses of a botanicals and organic acids containing blend, and compare them with bacitracin. During the challenge different parameters were recorded, such as transepithelial electrical resistance, cell viability, mRNA expression, and reactive oxygen species production. CP induced inflammation with cytokine production and loss of epithelial barrier integrity. It was also able to induce reactive oxygen species production and increase the caspase expression leading to cellular death. The high dose of the blend acted similarly to bacitracin, preventing the disruptive effects of CP and inducing also an increase in zonula occludens-1 mRNA expression. The low dose only partially prevented the disruptive effects of CP but successfully reduced the associated inflammation. This study shows that the usage of thymol combined with two organic acids can protect primary chicken intestinal epithelial cells from CP-induced damages creating a valid candidate to substitute or adjuvate the antibiotic treatment against necrotic enteritis.

INTRODUZIONE

L'industria avicola è affetta da una varietà di agenti patogeni come *Salmonella spp.* [1], *Eimeria spp.*[2], *Clostridium spp.*[3] e molti altri, che sono associati a elevate perdite economiche dovute all'aumento dei tassi di morbilità/mortalità e costi elevati per le strategie di controllo [4]. L'enterite necrotica (NE), provoca perdite economiche stimate fino a 6 miliardi di dollari all'anno [5] ed è una delle malattie ad alto impatto economico più comuni negli allevamenti. L'agente eziologico della NE è il *Clostridium perfringens* (CP), un batterio Gram-positivo, anaerobico, sporigeno, a forma di bastoncino [3,6]. I tipi di CP A, C e G sono di particolare interesse per l'industria avicola perché sono stati associati a malattie nel pollame. Dei sette tipi di CP noti, sia A che G sono i principali agenti causativi di NE [7].

In passato, le malattie intestinali del pollo sono state studiate su modelli cellulari alternativi come fibroblasti, epatociti o cellule di altro tipo [8,9]. Pochi studi riportano gli

effetti di agenti patogeni o infiammazioni direttamente sulle cellule epiteliali intestinali di pollo (cIEC) in vitro [10–13], ma nessuno ha riportato un'indagine dettagliata sui diversi parametri cellulari coinvolti nell'integrità e nell'infiammazione della barriera intestinale. Inoltre, l'uso improprio di antibiotici nelle produzioni animali aggrava il problema dell'antibiotico-resistenza, contribuendo alla perdita di efficacia dei trattamenti antibiotici contro NE e accresce la necessità di trovare soluzioni alternative. In precedenza, Giovagnoni et al. (2019) [14], hanno studiato se gli acidi organici (OA) e i composti naturali identici che si trovano comunemente negli additivi per mangimi potessero essere usati come molecole alternative o adiuvanti insieme agli antibiotici convenzionali contro il CP [14]. Partendo da questo studio, è stata creata una miscela per combinare il potere antimicrobico degli OA con le proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie di sostanze aromatizzanti per contrastare gli effetti dell'enterite necrotica nel pollo.

Questo studio mirava a sviluppare e ottimizzare un modello di *challenge in vitro* per studiare gli effetti del CP sulle cIEC e per aiutare a caratterizzare gli effetti benefici e protettivi di alte e basse dosi di una miscela di sostanze aromatizzanti e OA che potrebbero essere usate come alternativa o adiuvante alla bacitracina, in futuro.

MATERIALI E METODI

Sostanze chimiche e reagenti

La miscela di sostanze aromatizzanti e acidi organici è stata testata a due diverse concentrazioni: una dose elevata (H-BLEND) corrispondente a 1300 ppm totali e una dose bassa (L-BLEND) corrispondente a 650 ppm totali.

Generazione del monolayer di enterociti di pollo

Il monolayer di enterociti è stato generato con il protocollo già pubblicato dal nostro gruppo nel 2021 [15].

Valutazione dell'effetto del challenge batterico

Il ceppo batterico utilizzato in questo studio era L' ATCC 13124 *Clostridium perfringens* tipo A (CP).

Il batterio è stato coltivato in terreno RCM a 37°C in condizioni anaerobiche. Per tutti i saggi è stato utilizzato come inoculo iniziale 5×10^5 CFU/mL, come raccomandato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Per valutare l'effetto del challenge batterico sulle cIEC sono stati utilizzati quattro diversi terreni di coltura cellulare:

- (1) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina come controllo negativo (gruppo CTR);
- (2) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina contenente CP in fase esponenziale ad una concentrazione di 5×10^5 CFU/mL (gruppo CP);
- (3) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina contenente 5×10^5 CFU/mL CP in fase esponenziale e bacitracina 2ppm (Cat. # B0125 - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA - gruppo BAC), utilizzato come controllo battericida;
- (4) Terreno di crescita senza penicillina/streptomina contenente 5×10^5 CFU/mL CP in fase esponenziale e H-BLEND (gruppo H-BLEND);
- (5) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina contenente 5×10^5 CFU/mL CP in fase esponenziale e L-BLEND (gruppo L-BLEND);

cIEC primarie sono state quindi utilizzate per effettuare le analisi riportate di seguito:

- a. Integrità del monostrato: le cIEC sono state coltivate per 7 giorni prima del challenge a 37°C e 5% di CO₂ su inserti Transwell coated con Matigel. Il giorno prima del challenge le cellule sono state adattate durante la notte alle condizioni anaerobiche (100% CO₂) a 37°C. L'anaerobiosi è stata generata in giare con AnaeroGen gas pack (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Il giorno 8, è stata misurata la resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) per verificare l'integrità del monostrato dopo l'adattamento in anaerobiosi, quindi le cellule sono state lavate tre volte con soluzione tampone fosfato per rimuovere la penicillina/streptomina contenuta nel normale mezzo di crescita. Dopo la misurazione della TEER e i lavaggi, è stato eseguito un cambio di mezzo per indurre il challenge, in base ai cinque terreni di coltura (n=6 per ciascun mezzo) elencati all'inizio del paragrafo corrente. Durante il challenge, le cellule sono state mantenute a 37°C e al 100% di CO₂ in una giara con un AnaeroGen gas pack. La TEER è stata misurata 1,5 ore e 3 ore dopo l'inizio della prova. Alla fine del challenge, le cellule sono state raccolte dai filtri per le analisi qPCR.
- b. Saggi di vitalità e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS): le cIEC sono state coltivate per 3 giorni prima del challenge a 37°C e 5% di CO₂ su una piastra da 96 pozzetti coated con Matrigel. Quindi sono state adattate durante la notte a condizioni anaerobiche (100% CO₂) a 37°C e il giorno 4 sono state usate come descritto per la valutazione dell'integrità del monostrato (n=6 per ciascun mezzo). Durante la prova, le cellule sono state mantenute a 37°C e al 100% di CO₂ in una giara con un AnaeroGen gas pack. La vitalità è stata valutata con il kit Prestoblue (Thermo Fisher Scientific) dopo 1,5 ore e 3 ore dall'inizio del challenge e il test di produzione di ROS CellRox DeepRed (Thermo Fisher Scientific) è stato eseguito solo dopo 1,5 ore a causa del forte effetto citotossico del CP che avrebbe interferito con il corretto rilevamento dei ROS se misurato dopo 3h.

Caratterizzazione e valutazione dell'espressione genica di marcatori di infiammazione e apoptosi

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit Nucleospin[®] RNA (Macherey-Nagel) come descritto dal produttore. Dopodiché l'RNA estratto è stato quantificato tramite spettrofotometria (μ Drop[™] Varioskan Lux, Thermo-Scientific) e 500 ng sono stati poi retro-trascritti a cDNA utilizzando il kit iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories), come da specifiche del produttore. La qPCR è stata eseguita utilizzando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) e i primers dei vari geni sono stati utilizzati ad una concentrazione di 500 nM. Il ciclo di amplificazione prevedeva 5 minuti a 95°C, poi 40 cicli composti da 5 secondi a 95°C e 30 secondi a 60°C. L'elenco dei primers utilizzati è riportato in tabella 1 (Tab 1). I risultati sono stati espressi utilizzando il metodo del $\Delta\Delta C_t$ [16].

	<i>Gene</i>	<i>Sequenza primers (5' -> 3')</i>	<i>Lunghezza prodotto (bp)</i>	<i>Accession N.</i>
Tight Junctions	Zonula occludens-1	F: TCTGCACAGTGAGGTTGGCT R: GGCTGTCTGCATCGGTGT	145	XM_004934975
	Occludina-1	F: TGCTTTTGCCCAAGCAGGAA R: TGTGGGAGAGGCACCAGTTG	153	NM_204417
	Claudina-1	F: TCGGTGGTGGTCACTTCGTC R: CGCTGATTTACGGGCCGAAC	113	NM_001004768
Citochine	IL1 β	F: TGCCTGCAGAAGAAGCCTCG R: CTCCGCAGCAGTTTGGTCAT	137	NM_204524.1
	IL6	F: GCAGGACGAGATGTGCAAGA R: ACCTTGGGCAGGTTGAGGTT	84	NM_204628.1
	IL8	F: AGCTGCTCTGTGCGAAGGTA R: GCTTGGCGTCAGCTTCACATC	124	NM_205498.1
	INF γ	F: ACAACCTTCCTGATGGCGTG R: AGTTCATTCGCGGCTTTGCG	100	NM_205149.1
Marker infiammatori	iNOS	F: CCCTCCAGCTGATCAGACTATC R: GTGTGCAAGCCGGAATCTTTT	86	NM_204961.1
	Toll-like receptor 4	F: CCTGGGTCTAGCAGCCTTCC R: TGGCCCAGATTCAGCTCCTG	129	NM_001030693
	Caspasi 1	F: CTGTGGGATTCTCCGACCCC R: GCCCTACGGGTTCTGCTCTC	148	XM_040650618
	Caspasi 3	F: TACTCCTGGAGGAACGCAGC R: TGCCACTCTGCGATTTACACG	123	NM_204725.1
	MAPK-1	F: TGTGACTTCGGACTGGCTCG R: AGGAGCCCTGTACCAACGTG	93	XM_015275131
Ref.	RPLP0	F: TCACGGTAAAGAGGGGAGGTG R: CTTGCTCAGTCCCCAGCCTT	143	NM_205179

Tabella 1: Sequenze primers utilizzate per la caratterizzazione biomolecolare. IL=interleuchina; INF γ =interferon-gamma; MAPK=proteina chinasi attivata dal mitogeno; iNOS=Ossido nitrico sintasi inducibile; TLR4=Toll-like receptor 4; RPLP0= proteina ribosomiale acida 60S P0.

RISULTATI

La Figura 1 riporta i valori di TEER misurati a 1,5 e 3 ore dopo l'infezione.

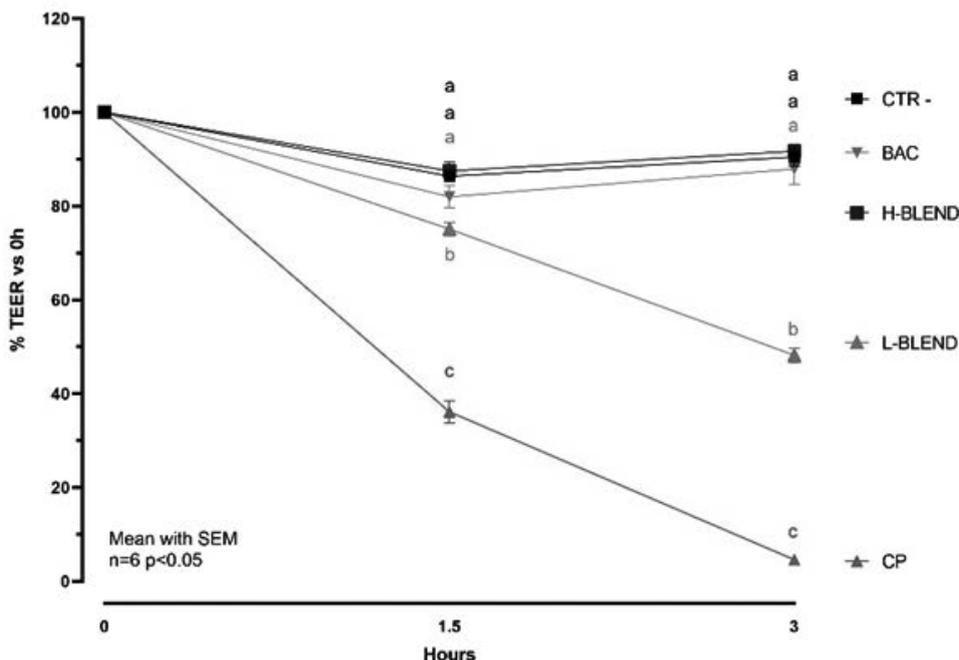


Figura 1: Percentuale di resistenza elettrica trans-epiteliale relativa dopo 1,5 e 3 ore di challenge con *C. perfringens* – CTR = Controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm; H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative (p < 0,05); (2-way ANOVA Tukey's multiple comparisons).

CP ha mostrato un forte effetto sulla barriera epiteliale, considerando che è stato in grado di distruggere completamente il monostrato cellulare dopo 3 ore. La bacitracina utilizzata come controllo battericida, ha impedito la diminuzione della TEER che è rimasta simile al controllo in entrambe le rilevazioni. L'H-BLEND ha protetto le cellule dall'azione di CP in modo simile all'antibiotico, mentre l'L-BLEND ha parzialmente fallito con un calo TEER del 50% dopo 3 ore. Questo risultato è stato confermato anche dal test di vitalità, riportato in Figura 2, che ha mostrato una riduzione della vitalità cellulare, nel gruppo con CP, del 13% dopo 1,5 ore e del 37% dopo 3 ore.

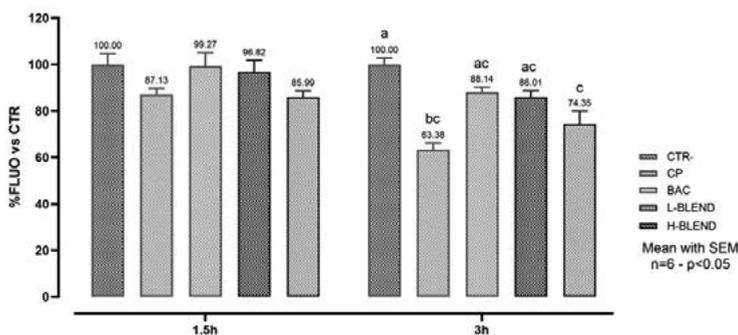


Figura 2: Vitalità cellulare dopo 1,5 h e 3 h di challenge con *C. perfringens* – CTR = controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm; H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative (p < 0,05); (2-way ANOVA Tukey’s multiple comparisons).

Bacitracina e H-BLEND hanno impedito la morte cellulare mantenendo valori di vitalità cellulare più elevati. L-BLEND ha registrato una riduzione della vitalità vicino al 26% dopo 3 ore.

La Figura 3 riporta gli effetti del CP sulla produzione di ROS che mostrano un aumento di 20 volte della produzione di ROS nel gruppo con challenge, rispetto al controllo, già dopo 1,5 ore. I livelli di ROS sono stati ridotti di 4 volte dal blend alla concentrazione maggiore (H-BLEND) e solo 2 volte dal blend a concentrazione minore (L-BLEND).

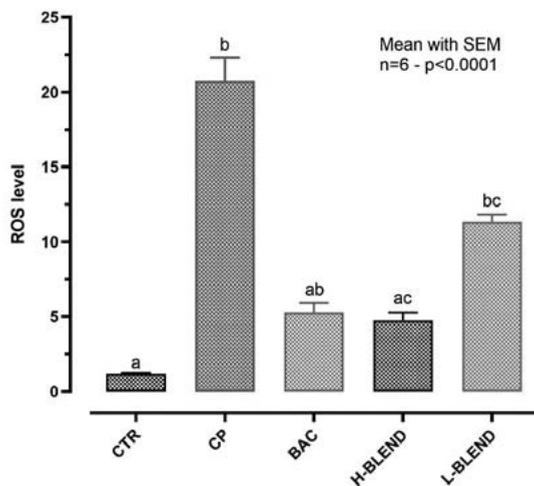


Figura 3: Produzione di ROS dopo 1,5 ore di challenge con *C. perfringens*. Il saggio di produzione di specie reattive dell’ossigeno è stato eseguito solo dopo 1,5h a causa del forte effetto citotossico di CP che interferisce con la corretta rilevazione dei ROS – CTR = Controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm;

H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative ($p < 0,0001$); (Kruskal-Wallis test multiple comparisons).

Nella Figura 4 sono riportati i risultati della qPCR. CP ha ridotto l'espressione di Zonula occludens-1 (ZO1) e claudina-1 (CLDN1) e ha aumentato significativamente l'espressione delle citochine pro-infiammatorie: IL1 β (2 volte superiore), IL6 (25 volte superiore), IL8 (60 volte superiore) e INF γ (5 volte superiore). La miscela ad entrambe le dosi ha ridotto significativamente l'espressione di IL1 β , IL6 e IL8. L'H-BLEND è riuscito a ridurre INF γ e aumentare l'espressione di ZO1 rispetto al controllo. La dose minore è stata inefficace contro l'aumento dell'espressione di INF γ e la riduzione dell'espressione di ZO1 e CLDN1.

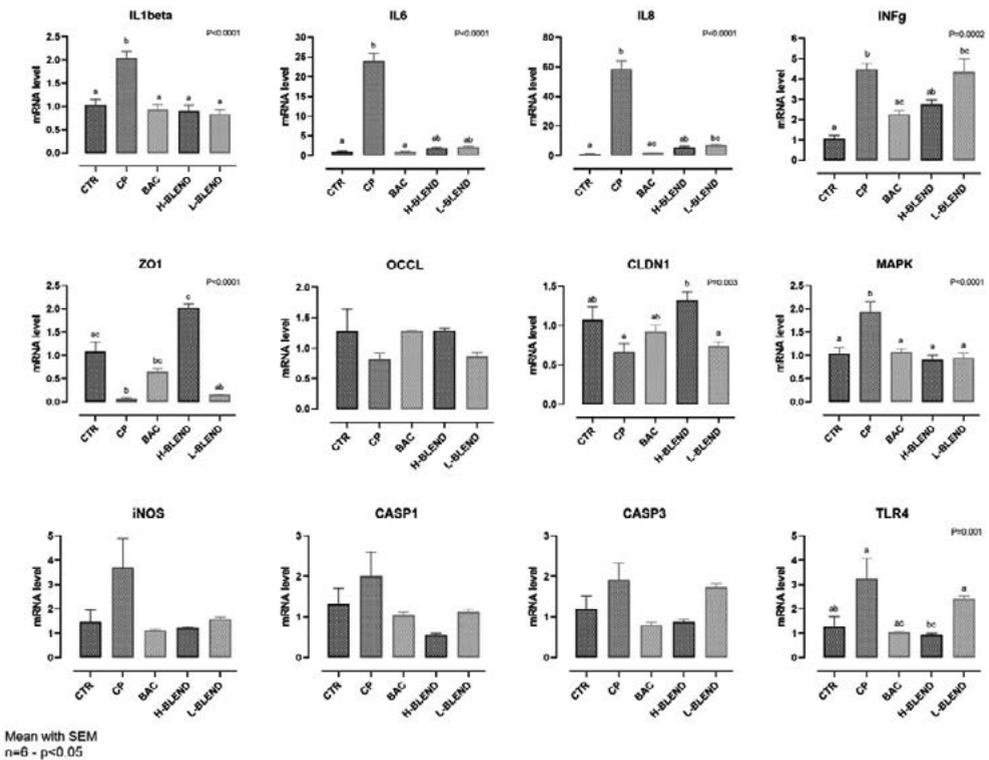


Figura 4: Espressione genica dopo 3 ore di challenge con *C. perfringens* - CTR = Controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm; H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - INF γ = Interferone γ ; ZO1 = Zonula occludente 1; OCCL = Occludina; CLDN1 = Claudina1; MAPK = protein chinasi attivata dal mitogeno; iNOS = ossido nitrico sintasi inducibile; TLR4 = recettore toll-like 4; CASP1 = caspasi 1; CASP3 = caspasi 3; - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative ($p < 0,05$); (one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons).

Inoltre, i livelli della ossido-nitrico-sintasi inducibile (iNOS), del toll-like receptor 4 (TLR4), caspasi-1 (CASP1) e caspasi-3 (CASP3) erano numericamente aumentati nelle cellule sottoposte a challenge con CP, rispetto a quelle di controllo (gruppo di controllo negativo e bacitracina). L'H-BLEND è riuscito a ridurre i livelli di questi marcatori molecolari riportandoli ai livelli del controllo.

DISCUSSIONE

L'industria avicola è colpita da diversi agenti patogeni e problemi che causano perdite di miliardi di dollari USA ogni anno [17]. Gli allevatori sono costantemente alla ricerca di modi per migliorare la produttività e ridurre l'impatto di varie malattie. Il CP è l'agente eziologico collegato all'enterite necrotica nel pollo e le prime fasi di NE sono associate a forti reazioni infiammatorie a livello intestinale [6]. Per trovare additivi per mangimi che possano agire contro queste patologie, è necessario sviluppare un modello standardizzato in vitro che consenta uno studio approfondito dei meccanismi patologici legati alla patogenesi del CP. Questo studio mirava a sviluppare e ottimizzare un modello di *challenge in vitro* per studiare gli effetti sulle cIEC del CP e per testare gli effetti protettivi di una miscela composta da sostanze aromatizzanti e acidi organici come alternativa o adiuvante a un antibiotico comunemente usato nelle produzioni avicole. In particolare, l'H-BLEND conteneva una concentrazione inibitoria di OA per confrontare la miscela con la bacitracina. Invece, L-BLEND conteneva una concentrazione sub-inibitoria dei composti per testare un possibile effetto sinergico contro gli effetti indotti da CP sulle cellule.

Per studiare gli effetti di un challenge indotto da CP sulle cellule epiteliali, le cIEC sono state coltivate su inserti Transwell per imitare la barriera intestinale. Il CP ha ridotto i valori TEER fino al 50-80% rispetto al controllo, indicando un effetto distruttivo sulla barriera epiteliale. CP ha fortemente influenzato l'espressione dell'mRNA di ZO1, OCCL e CLDN1. La miscela testata di OA e sostanze aromatizzanti alla dose più alta è riuscita a proteggere la barriera intestinale prevenendo il calo della TEER in modo simile all'antibiotico. È interessante notare che l'H-BLEND ha anche aumentato l'espressione dell'mRNA di ZO1 agendo come agente protettivo e rinforzante. La bacitracina utilizzato alla sua minima concentrazione inibente, invece, ha impedito la caduta di TEER ma senza indurre un aumento dell'espressione dell'mRNA di ZO1. L-BLEND ha protetto solo parzialmente dalla caduta TEER senza purtroppo essere in grado di aumentare l'espressione di mRNA di ZO1.

L'ATCC 13124 *C. perfringens* tipo A utilizzato in questo studio produce alfa tossina (CPA) e perfringolisina-o (PFOA). PFOA e CPA sono due tossine che hanno una forte attività *pore-forming*. Il PFOA agisce sul colesterolo creando buchi nelle membrane contenenti colesterolo [18].

La CPA agisce principalmente sui fosfolipidi come la fosfatidilcolina e può attivare la caspasi-3 causando la morte cellulare [19], e la cascata infiammatoria MEK1/2, ERK1/2 correlato all'attivazione di NF- κ B [20].

Monturiol-Gross e colleghi (2012) riportano che la CPA provoca stress ossidativo e attivazione della via MEK/ERK [21]. Inoltre, le vie MEK1/2 ed ERK1/2 sono antagonizzate dai terpeni e ricoprono un ruolo importante nella generazione di IL8 come riportato da Wang et al., (2006) [22]. Inoltre, in questo studio, è stata osser-

vata l'attivazione di MAPK (ERK2), che si ritiene stabilizzi l'mRNA di IL8 ed è associato alla generazione di ROS [20]. La miscela utilizzata in questo studio ha evidenziato una generazione di ROS fortemente ridotta grazie alle capacità antiossidanti delle sostanze aromatizzanti e all'attivazione della via Nrf2 da parte degli acidi organici [23].

Recentemente Takehara et al. (2021), hanno ipotizzato che CPA e PFOA potrebbero attivare il TLR4 sulle cellule intestinali [25]. Questo risultato è stato osservato anche in questo studio dall'espressione qPCR di TLR4. L'attivazione di TLR4 potrebbe anche essere correlata a un aumento dell'espressione di IL6, IL8 e IL1 β attraverso la via Nf-kB [26]. La miscela utilizzata in questo studio è riuscita a ridurre fortemente l'effetto di CP su quelle tre citochine ad entrambi i dosaggi. È interessante notare che anche la L-BLEND che contiene concentrazioni sub-inibenti dei composti è riuscita a ridurre l'espressione dell'mRNA delle citochine pro-infiammatorie. Ciò indica forti proprietà antinfiammatorie della miscela anche a concentrazioni sub-inibenti.

CONCLUSIONI

Insieme agli acidi organici utilizzati, le sostanze aromatizzanti formano una miscela che ha un forte potere antimicrobico contro il *C. perfringens*, riducendo la carica batterica, proteggendo così dall'infiammazione e dallo stress ossidativo causati dal challenge. Inoltre, la miscela testata ha mostrato effetti antinfiammatori a concentrazione sub-inibitoria, ma senza proteggere completamente la barriera epiteliale. Questi risultati potrebbero essere un interessante punto di partenza per un futuro test degli effetti di questa miscela *in vivo* e candidarla come possibile alternativa alla bacitracina nella produzione del pollame da carne.

BIBLIOGRAFIA

1. Vandeplas S, Dauphin Rd, Beckers Y, Thonart P, Théwis A. Salmonella in Chicken: Current and Developing Strategies To Reduce Contamination at Farm Level. *J Food Prot.* 2010;73:774–85.
2. Huang G, Tang X, Bi F, Hao Z, Han Z, Suo J, et al. Eimeria tenella infection perturbs the chicken gut microbiota from the onset of oocyst shedding. *Vet Parasitol.* 2018;258:30–7.
3. Baba E, Ikemoto T, Fukata T, Sasai K, Arakawa A, McDougald LR. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with Clostridium perfringens and Eimeria necatrix. *Vet Microbiol.* 1997;54:301–8.
4. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Immerseel FV. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 2011;40:341–7.
5. Wade B, Keyburn A. The true cost of necrotic enteritis. *World Poult.* 2015;31:16–7.
6. Paiva D, McElroy A. Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry. *J Appl Poult Res.* 2014;23:557–66.
7. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, El-Shall NA, Saad AM, Salem HM, et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. *Poult Sci.* 2022;101:101590.

8. Jagadish B, Saxena M. Salmonella Typhimurium invasion induces apoptosis in chicken embryo fibroblast. *Curr Sci.* 2008;95:512–4.
9. Felici M, Tugnoli B, Piva A, Grilli E. In Vitro Assessment of Anticoccidials: Methods and Molecules. *Anim Open Access J MDPI.* 2021;11:1962.
10. Immerseel FV, Buck JD, Smet ID, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Interactions of Butyric Acid– and Acetic Acid–Treated Salmonella with Chicken Primary Cecal Epithelial Cells In Vitro. *Avian Dis.* 2004;48:384–91.
11. Dimier-Poisson IH, Bout DT, Quéré P. Chicken Primary Enterocytes: Inhibition of *Eimeria tenella* Replication After Activation with Crude Interferon- γ Supernatants. *Avian Dis.* 2004;48:617–24.
12. Guo S, Li C, Liu D, Guo Y. Inflammatory responses to a *Clostridium perfringens* type A strain and α -toxin in primary intestinal epithelial cells of chicken embryos. *Avian Pathol.* 2015;44:81–91.
13. Bar Shira E, Friedman A. Innate immune functions of avian intestinal epithelial cells: Response to bacterial stimuli and localization of responding cells in the developing avian digestive tract. Kufer TA, editor. *PLOS ONE.* 2018;13:e0200393.
14. Giovagnoni G, Tugnoli B, Piva A, Grilli E. Organic Acids and Nature Identical Compounds Can Increase the Activity of Conventional Antibiotics Against *Clostridium Perfringens* and *Enterococcus Cecorum* In Vitro. *J Appl Poult Res.* 2019;28:1398–407.
15. Ghiselli F, Rossi B, Felici M, Parigi M, Tosi G, Fiorentini L, et al. Isolation, culture, and characterization of chicken intestinal epithelial cells. *BMC Mol Cell Biol.* 2021;22:12.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001;25:402–8.
17. Espinosa R, Tago D, Treich N. Infectious Diseases and Meat Production. *Environ Resour Econ.* 2020;76:1019–44.
18. Yamamura K, Ashida H, Okano T, Kinoshita-Daitoku R, Suzuki S, Ohtani K, et al. Inflammasome Activation Induced by Perfringolysin O of *Clostridium perfringens* and Its Involvement in the Progression of Gas Gangrene. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 14];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6823607/>
19. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6:99–104.
20. Oda M, Ikari S, Matsuno T, Morimune Y, Nagahama M, Sakurai J. Signal Transduction Mechanism Involved in *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin-Induced Superoxide Anion Generation in Rabbit Neutrophils. *Infect Immun.* American Society for Microbiology; 2006;74:2876–86.
21. Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Campos-Rodríguez D, Mora R, Rodríguez-Vega M, Marks DL, et al. Internalization of *Clostridium perfringens* α -toxin leads to ERK activation and is involved on its cytotoxic effect. *Cell Microbiol.* 2014;16:535–47.
22. Wang Y, DiSalvo M, Gunasekara DB, Dutton J, Proctor A, Lebhar MS, et al. Self-renewing Monolayer of Primary Colonic or Rectal Epithelial Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;4:165-182.e7.

23. Ashrafiyan H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijević D, Smith AC, Mitchell SJ, et al. Fumarate Is Cardioprotective via Activation of the Nrf2 Antioxidant Pathway. *Cell Metab.* 2012;15:361–71.
24. Saleh HA, Yousef MH, Abdelnaser A. The Anti-Inflammatory Properties of Phytochemicals and Their Effects on Epigenetic Mechanisms Involved in TLR4/NF- κ B-Mediated Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 5];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.606069>
25. Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M. Toll-Like Receptor 4 Protects Against *Clostridium perfringens* Infection in Mice. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. *Frontiers*; 2021 [cited 2021 Jun 14];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.633440/full>
26. Nyati KK, Masuda K, Zaman MM-U, Dubey PK, Millrine D, Chalise JP, et al. TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:2687–703.

EFFETTO DELL'INTEGRAZIONE DIETETICA CON CITROBEX® SUL MICROBIOMA INTESTINALE DEL BROILER

De Cesare A.¹, Indio V.¹, Lucchi A.², Pasquali F.², Parra Titos E.³, Bertuzzi S.³, Manfreda G.²

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;*

² *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro Alimentari (DISTAL) – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Viale Giuseppe Fanin, 44 – 40127 Bologna (BO), Italia;*

³ *Vetoquinol Italia srl, Via Piana 265, 47032 Bertinoro (FC), Italia.*

Summary

The objective of the present research activity was to compare the efficacy of the supplementation of an emulsifier in broiler chicken diets on microbiome of intestinal tract of broiler. A total of 1,000 1-day-old male chicks Ross 308, obtained from the same hatching session, housed at a stocking density of 10 chicks/m² for a total of 25 birds per pen, has been divided in four experimental groups (250 bird/group): CON=Control; CBX1= Citrobex® 100 g/quintal water during starter phase from 0 to 14 days of age; CBX2= Citrobex® 100 g/quintal water during grower phase from 15 to 28 days of age and CBX3= Citrobex® 100 g/quintal water during finisher phase from 28 to 42 days of age. A total of 70 caecal content were collected at 21 and 42 days of age and shotgun metagenomic sequencing was performed using the NextSeq500 (Illumina) 2x150 bp in paired-end mode. The scaffold produced by each sequencing sample was uploaded on MG-RAST web tool that was adopted to detect functional genes based on KEGG Orthology (KO) level 3. The bioinformatic tool Metaphlan3 was implemented to profile the composition of the microbial communities that was evaluated at the different taxonomic level including phylum, class, order, family, genus and species. For both taxonomic levels and functional genes, the relative frequency of abundance was computed and the two-sided Welch's t-test was applied in order to highlight statistically significant differences in terms of taxa abundance and gene function. The results of microbiota analysis showed an increase of microbial diversity in the treated groups and in particular in the CBX3 group confirming a positive impact of the treatment in order to prevent gastrointestinal dysbiosis. In particular Lachnospirillum genera increased in the caeca of broiler of CBX3 group and that play an important role in the production of butyrate which is the preferred energy source for the gut epithelial cells. Moreover, the significant increase of Lactobacillus gallinarum in the treated group (CBX1, CBX2 and CBX3) and Lactobacillus crispatus in CBX2 in comparison with CON group can impact on health of animal. From metabolic point of view the statistically increase of cobalt/nickel transport system and antibiotic transport system ATP-binding protein in CBX2 and CBX3 groups in comparison with CON group represented an important transmembrane transport of a diverse array of substrates including drugs, sugars, ions, amino acids and proteins and that could be associated to the increase of lachnospirillum more abundant in the treated groups. Finally, the significant increase of DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 in the CBX2 and

CBX3 groups in comparison with CON group play a relevant role to prevent in the modification of DNA by methylation that commonly occurs in prokaryotes, as 'immune responses' to phage infection.

INTRODUZIONE

La carne di pollame è un alimento molto popolare, molto versatile che viene consumato in grandi quantità rispetto ad altre carni. La sua produzione, tuttavia, richiede una ottimale gestione dell'allevamento per ridurre le patologie e minimizzare i costi. In passato l'impiego di antibiotici, come promotori della crescita, rappresentava lo strumento più efficace per raggiungere gli obiettivi di una elevata redditività delle produzioni avicole. A partire dal 2006 l'impiego degli antibiotici quali promotori di crescita è stato vietato anche in considerazione della crescente incidenza della resistenza agli antibiotici, considerata una delle maggiori minacce per la salute pubblica a livello globale. Ciò ha portato a ricercare possibili sostituti, i quali modulando il microbiota intestinale in modo benefico e "naturale" permettano di migliorare la salute degli animali garantendo ottimali livelli produttivi.

Tra i diversi composti indagati un elevato interesse ha riguardato l'impiego di probiotici (De Cesare et al., 2017; Qiu et al., 2022) come pure l'utilizzo di composti bioattivi naturali di origine vegetale, in particolare gli acidi fenolici, i flavonoidi e i terpenoidi (EO), per le loro proprietà multifunzionali e il potenziale nutraceutico (Segneanu et al., 2017; Djenane, 2015). Tali composti naturali possiedono proprietà antitumorali e forniscono vari effetti benefici per la salute tra cui attività antinfiammatorie, antiossidanti e antimicrobiche (Degirmenci & Erkurt 2020). Sono anche usati per proteggere gli alimenti da agenti patogeni e batteri che alterano il cibo (Burt, 2004), dall'irrancidimento, dallo scolorimento o dal deterioramento dovuto all'autoossidazione (Hashemi et al. 2016).

In commercio sono attualmente disponibili estratti vegetali da *Citrus aurantium*, noto come arancia amara, un albero che appartiene all'ordine dei Geraniales e alla famiglia delle Rutaceae. I principali costituenti biologici attivi presenti nel *Citrus aurantium* sono i flavonoidi, in particolare l'esperidina, la naringina e gli alcaloidi, principalmente sinefrina, con effetti medici benefici sulla salute umana (Pellati et al., 2002). L'estratto di *Citrus aurantium* è stato usato nella medicina tradizionale cinese per trattare la nausea, la stitichezza, il cancro, gli effetti cardiovascolari e come sedativi (Suntar et al., 2018).

Nel settore animale l'estratto etanolico di fogli di *Citrus aurantium* è stato efficacemente impiegato nel controllo della coccidiosi (Ishaq et al., 2022). L'azione benefica si è ipotizzata possa essere legata ad una modulazione della microflora intestinale che porterebbe ad una riduzione dell'eliminazione di oocisti. Tuttavia ad oggi studi sulla modulazione della microflora intestinale nel broiler a seguito dell'impiego di estratti di *Citrus aurantium* non sono disponibili nonostante il significativo progresso delle tecniche analitiche basate sul sequenziamento che consentono di ottenere un profilo completo includente anche specie microbiche non coltivabili con i tradizionali sistemi analitici.

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di comparare l'effetto dell'integrazione nell'acqua da bere di un estratto vegetale, ottenuto da *Citrus aurantium* e somministrato in differenti fasi dell'allevamento, sul microbiota e sulle funzioni metaboliche del cieco del broiler utilizzando la tecnica dell'analisi metagenomica.

MATERIALI E METODI

Un totale di 1.000 pulcini maschi di 1 giorno Ross 308, ottenuti dalla stessa sessione di schiusa, e suddivisi omogeneamente in base al peso sono stati accasati ad una densità di 10 pulcini/m² per un totale di 25 capi per box, e suddivisi in quattro gruppi sperimentali (250 capi /gruppo): CON=Controllo; CBX1= Citrobex® 100 g/ql di acqua in fase di avviamento da 0 a 14 giorni di età; CBX2= Citrobex® 100 g/ql d'acqua durante la fase di accrescimento dai 15 ai 28 giorni di età e CBX3= Citrobex® 100 g/ql d'acqua durante la fase di ingrasso dai 28 ai 42 giorni di età. Tutti i pulcini al momento della schiusa sono stati vaccinati contro il virus della bronchite infettiva, della malattia di Marek, della malattia di Newcastle e della malattia di Gumboro.

Campionamento

In totale 70 broiler appartenenti ai quattro differenti gruppi sperimentali CON (n=20), CBX1(n=20) CBX2 (n=20) e CBX3 (n=10) sono stati sacrificati a 21 (30 animali) e 42 giorni (40 animali) di vita. Dopo abbattimento è stato prelevato aseptivamente il contenuto del cieco di ciascun animale ed immediatamente sottoposto a congelamento a -80°C fino al momento dell'analisi.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto da ciascun campione utilizzando una procedura a base di biglie come previsto dal kit QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia). Il DNA estratto da ciascun campione è stato quantificato utilizzando un BioSpectrometer® (Eppendorf, Milano, Italia) per valutare la resa del DNA, in termini di quantità e qualità.

Preparazione delle library e sequenziamento metagenomico

Il DNA totale di ciascun campione è stato frammentato e contrassegnato con indici di sequenziamento e adattatori utilizzando il Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA). Il sequenziamento metagenomico è stato eseguito utilizzando NextSeq500 (Illumina) 2x150 bp in modalità paired-end.

Analisi bioinformatiche delle sequenze

Il filtraggio e il taglio delle reads ottenute dal sequenziamento sono stati eseguiti utilizzando il tool Adapter Removal. Le sequenze ottenute dopo filtraggio e taglio sono state elaborate con la pipeline SOAPdenovo2 al fine di eseguire il de novo assembly adottando i parametri “-K 55 -p 26 -M 3 -F -u”. Lo scaffold prodotto da ciascun campione di sequenziamento è stato caricato sulla piattaforma MG-RAST al fine di rilevare i geni funzionali utilizzando il KEGG Orthology database. Il tool bioinformatico Metaphlan3 è stato implementato per ottenere il profilo microbico dei singoli campioni comprendente phylum, classe, ordine, famiglia, genere e specie.

Analisi statistica dei dati

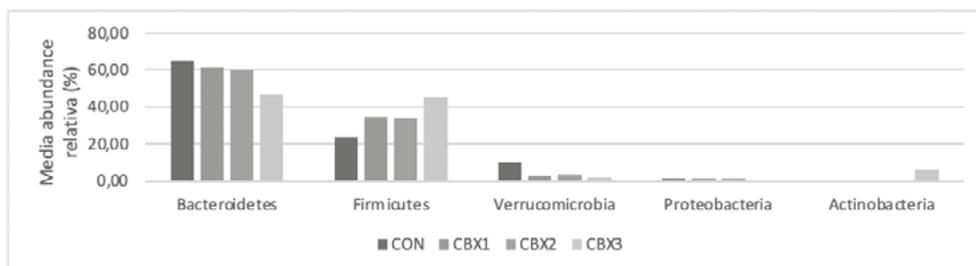
Al fine di valutare la diversità del microbiota nei diversi gruppi sperimentali è stato calcolato il valore alfa adottando i modelli Shannon, Simpson e Fisher mediante il tool Vegan. Sia per i livelli tassonomici che per i geni funzionali è stata calcolata la frequenza relativa dell'abbondanza ed è stato applicato il test t di Welch a due code per evidenziare differenze statisticamente significative in termini di abbondanza di taxa e geni funzionali.

RISULTATI

Risultati relativi al microbiota

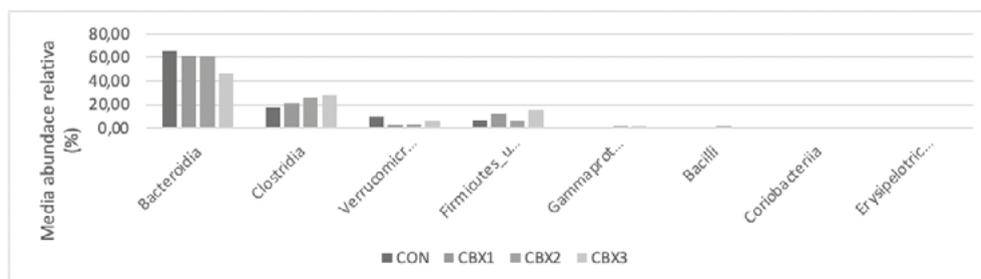
In termini generali i risultati relativi al microbiota cecale dei polli da carne sottoposti a sperimentazione hanno mostrato scarse o nulle differenze statistiche a 21 giorni di età mentre rilevante differenze si sono osservate a 42 giorni di età. In particolare i risultati relativi ai diversi phylum batterici a 42 giorni di età hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo dell'abundance relativa di Firmicutes in tutti i gruppi trattati con Citrobex® rispetto al gruppo di controllo assieme ad una riduzione significativa dei Bacteroidetes nel gruppo CBX3 (Figura 1).

Figura 1 – Confronto delle medie di abundance relativa dei phylum batterici rilevati a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



In termini di classi batteriche l'aumento dei Firmicutes a 42 giorni di età nei gruppi trattati era associato ad un aumento significativo di Clostridia nei gruppi CBX2 (26,04%) e CBX3 (28,16%) rispetto al Controllo (17,01%) e di Firmicutes unclassified nel gruppo CBX3 (15,74%) rispetto al gruppo di Controllo (6,40%). Contestualmente la riduzione significativa dei Bacteroidetes era associata ad una significativa riduzione della classe dei Bacteroidia nel gruppo CBX3 (46,58%) rispetto a tutti gli altri gruppi (Figura 2).

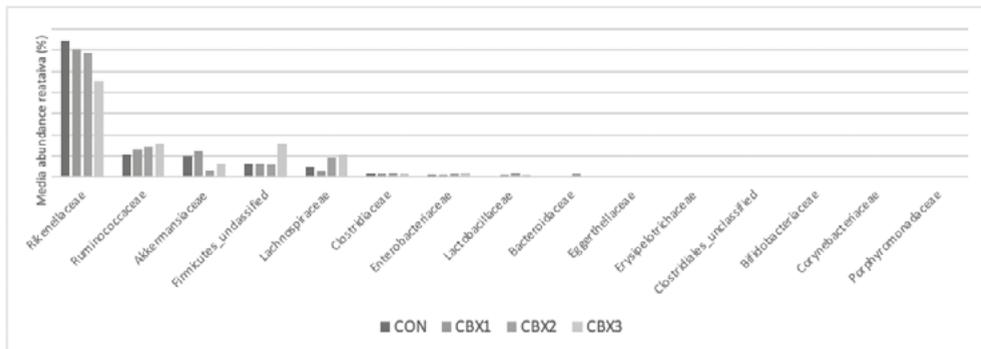
Figura 2 – Confronto delle medie di abundance relativa delle classi batteriche rilevate a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



L'analisi statistica dell'abundance relativa delle diverse famiglie batteriche ha mostrato i seguenti risultati statisticamente significativi: 1) Lachnospiraceae più elevata nei gruppi CBX2 (9,21%) e CBX3 (10,67%) rispetto al Controllo (4,57%); 2) Lactobacillales più elevata nel gruppo CBX2 (2,14%) rispetto agli altri gruppi

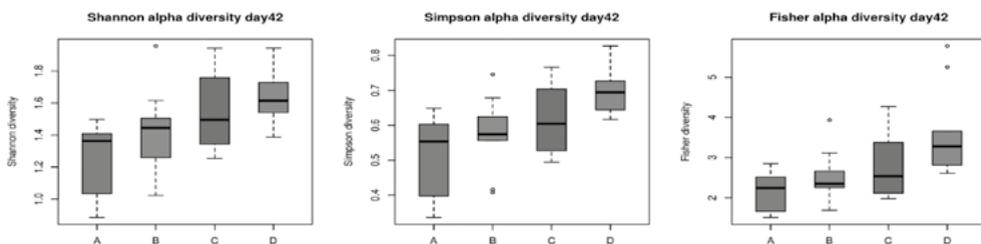
sperimentali; 3) Firmicutes unclassified più elevata nel gruppo CBX3 (15,74%) rispetto al Controllo (6,40%); 4) Bacteroidaceae più elevate nel gruppo CBX3 (0,66%) rispetto al Controllo (0,18%); 5) Rikenellaceae più bassa nel gruppo CBX3 (45,19%) rispetto ad altri gruppi sperimentali (Figura 3).

Figura 3 – Confronto delle medie di abundance relativa delle famiglie batteriche rilevate a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età



In termini di diversità dei generi batterici rilevati il test dell'alpha diversity condotto con 3 differenti modelli statistici ha confermato un aumento di diversità nei gruppi trattati ed in particolare nel gruppo CBX3 rispetto al Controllo (Figura 4).

Figure 4 – Alpha diversity dei generi batterici rilevati a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



A= Gruppo CON; B=Gruppo CBX1; C=Gruppo CBX2; D=Gruppo CBX3

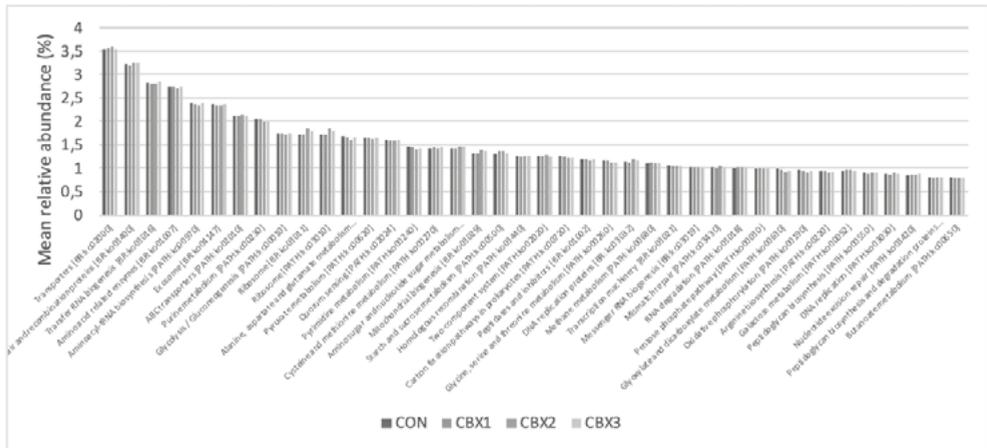
In termini di specie batteriche nel cieco dei polli a 42 giorni di età i risultati complessivi hanno mostrato le seguenti differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali: 1) *Lachnoclostridium* sp An118, *Lachnoclostridium* sp An131, *Lachnoclostridium* sp An138 e *Lactobacillus gallinarum* sono risultati più elevati nei gruppi trattati (CBX1, CBX2 e CBX3) rispetto al gruppo di Controllo; 2) *Anaeromassilibacillus* sp An172 è risultato più elevato in CBX2 (1,24%) e CBX3 (0,45%) rispetto al gruppo di Controllo (0,07%); 3) *Lactobacillus crispatus* è risultato più elevato nel gruppo CBX2 (0,68%) rispetto al gruppo CON (0,19%);

4) Pseudoflavonifractor sp An184, Bacteroides fragilis e Firmicutes CAG 94 sono risultati più elevati nel gruppo CBX3 (7,46%; 0,66%; 15,74) rispetto al gruppo di Controllo (3,60%; 0,18%; 6,40); 5) Alistipes sp_CHKCI003 e Gordonibacter pamelaee sono risultati inferiori nel gruppo CBX3 (45,19%; 0,06%) rispetto ad altri gruppi sperimentali.

Risultati relativi ai geni funzionali

I risultati complessivi delle prime 40 vie metaboliche (livello 3) identificate sul contenuto cecali dei polli da carne a 42 giorni di età nei diversi gruppi sperimentali hanno mostrato le seguenti differenze statisticamente significative: 1) riduzione del metabolismo delle purine, della pirimidina, glicina, della serina e della treonina, del gliossilato e del dicarbossilato, nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto ai gruppi di Controllo e CBX1; 2) riduzione del metabolismo di alanina, aspartato e glutammato, della fosforilazione ossidativa e della biosintesi dell'arginina nel gruppo CBX2 rispetto ai gruppi di Controllo e CBX1; 3) riduzione del metabolismo del butanoato nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di controllo; 4) aumento del metabolismo degli amminozuccheri, dei nucleotide sugar e della biogenesi mitocondriale, nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo; 5) Un aumento del ribosoma, DNA replication proteins and Mismatch repair nel gruppo CBX2 rispetto al gruppo di Controllo; 6) Aumento della biogenesi mitocondriale, del metabolismo della glicina, della serina e della treonina, del DNA repair and recombination proteins nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo CBX1; 7) aumento del metabolismo di alanina, aspartato e glutammato e della biosintesi dell'arginina nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo CBX2 (Figura 5).

Figura 5 – Confronto della media dell'abundance relativa dei pathway metabolici (livello 3) rilevati a livello cecale nei polli da carne dei diversi gruppi sperimentali a 42 giorni di età.



I risultati complessivi relativi alle prime 40 funzioni metaboliche identificate sul contenuto cecali dei polli da carne a 42 giorni di età nei diversi gruppi sperimentali hanno mostrato le seguenti differenze statisticamente significative: 1) riduzione del formate C-acetyltransferase, aspartyl-tRNA synthetase and DNA polymerase III

et al., 2017). Sebbene il propionato sia una fonte di energia meno preferita del butirrato, la sua produzione potrebbe rappresentare un equilibrio efficiente tra l'acquisizione di energia dai nutrienti disponibili e la crescita sostenuta dei polli da carne.

Anche l'aumento significativo di *Anaeromassilibacillus* sp. An200 e *Pseudoflavonifractor* sp. An184 nel gruppo CBX3, può essere associati ad un aumento della produzione di propionato e butirrato come riportato da Jing e collaboratori (2022).

Importante è l'aumento significativo di *Lactobacillus gallinarum* nei gruppi trattati (CBX1, CBX2 e CBX3) e *Lactobacillus crispatus* nel gruppo CBX2 rispetto al gruppo di Controllo. Uno studio recente ha dimostrato che *L. gallinarum* ha aumentato l'abundance di batteri probiotici intestinali e ridotto i potenziali patogeni intestinali (Sugimura et al., 2021). Inoltre diversi ceppi di *Lactobacillus*, tra cui *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* e *L. salivarius*, si sono dimostrati un'efficace alternativa agli antibiotici per il mantenimento della salute intestinale e della capacità immunitaria dei polli da carne.

Infine anche la significativa riduzione di *Alistipes* sp. CHKCI003 nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di Controllo è da considerarsi un effetto positivo del trattamento con Citrobex®. Infatti questo microrganismo è stato associato a patologie intestinali, cardiovascolari e riduzione della risposta immunitaria (Parker et al., 2020). Recenti studi di Jing e collaboratori (2022) hanno inoltre associato questa specie microbica al deposito di grasso nel broiler fattore che compromette la redditività delle produzioni avicole.

Relativamente alle funzioni metaboliche rilevate, la DNA (citosine-5)-metiltransferasi 1 gioca un ruolo rilevante nella metilazione del DNA fenomeno assai comune in organismi diversi come batteri, piante e mammiferi. Nei procarioti, la metilazione dei residui di citosina e adenina rappresenta una efficace "risposta immunitaria" all'infezione fagica. Inoltre la metilazione dell'adenina nei procarioti è anche coinvolta nella regolazione dell'inizio della replicazione del DNA e nel correggere errori nella replicazione del DNA (Kumar et al., 1994). Di conseguenza un significativo aumento di questa funzione metabolica nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo costituisce un aumento della risposta immunitaria e delle capacità di correzione degli errori di replicazione del DNA cellulare.

I trasportatori ABC (ATP-binding cassette) sono presenti in tutti e tre i domini della vita e mediano il trasporto transmembrana di una vasta gamma di substrati inclusi farmaci, zuccheri, ioni, amminoacidi e proteine. Il significativo aumento del cobalt/nickel transport system ATP-binding protein nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo è rilevante per la replicazione batterica dal momento che gli ioni nichel e cobalto sono richiesti dai procarioti per essere incorporati in diversi enzimi coinvolti nelle reazioni metaboliche centrali (Rodionov et al., 2006). Contestualmente l'aumento dell'antibiotic transport system ATP-binding protein nei gruppi CBX2 e CBX3 rispetto al gruppo di Controllo può essere associato all'attività inibente batterica presentata dal Citrobex® in prove in vitro (dati non riportati) probabilmente dipendente dall'azione dei flavonoidi presenti nel prodotto. Infine il significativo aumento della proteasi Lon ATP-dipendente nel gruppo CBX3 rispetto al gruppo di Controllo conferma l'effetto positivo del trattamento con Citrobex®. Questa proteasi è altamente conservata negli archaea, negli eubatteri, nei mitocondri e nei perossisomi eucariotici. Studi di Lee & Suzuki (2008) hanno dimostrato che Lon degrada selettivamente le proteine anormali e regolatorie e quindi svolge un ruolo significativo nel mantenimento della funzione e dell'integrità batterica e mitocondriale e più in generale dell'omeostasi cellulare.

CONCLUSIONI

La recente ricerca di modulatori del microbiota intestinale al fine di migliorare la salute degli animali garantendo ottimali livelli produttivi è rivolta all'impiego di composti bioattivi naturali di origine vegetale, in particolare acidi fenolici, flavonoidi e terpenoidi (EO). In questo studio si è analizzato l'effetto di un estratto vegetale da *Citrus aurantium*, commercializzato con il nome Citrobex® contenente diversi flavonoidi ed alcaloidi, quali esperidina, naringina e sinefrina, i quali hanno già dimostrato effetti benefici sulla salute umana (Pellati et al., 2002). In questa ricerca il Citrobex® somministrato nell'acqua da bere per due settimane continuativamente alla dose di 100g/ql in differenti momenti del ciclo di vita del broiler ha dimostrato complessivamente un impatto positivo sul microbiota cecale con un significativo incremento della diversità microbica ed in particolare di generi e specie batteriche, appartenenti prevalentemente al phylum dei Firmicutes. tutte produttrici di butirrati o propionati considerati metaboliti fondamentali per una condizione ottimale dello sviluppo e integrità della mucosa intestinale ossia di quello che viene definito come "gut health". In particolare il trattamento effettuato a fine ciclo ossia dal 28° giorno di vita fino alla macellazione è quello che ha prodotto i risultati migliori rispetto al gruppo di controllo. Tale effetto positivo è stato confermato anche dall'incremento dei geni funzionali associati ad una migliore risposta immunitaria (DNA citosine-5-metiltransferasi 1), i trasportatori ABC (ATP-binding cassette) e la proteasi Lon ATP-dipendente associati al mantenimento della funzione e dell'integrità batterica e mitocondriale, della replicazione batterica e più in generale dell'omeostasi cellulare.

BIBLIOGRAFIA

1. Burt S. Essential oils—their antibacterial properties and potential applications in food. *Int J Food Microbiol* 2004; 94:223–53.
2. De Cesare A., Sirri F., Manfreda G., Moniaci P., Giardini A., Zampiga M., & Meluzzi A. (2017). Effect of dietary supplementation with *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL (CECT 4529) on caecum microbioma and productive performance in broiler chickens. *PLoS One*. 12:e0176309 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176309>.
3. Degirmenci H. & Erkurt H. (2020). Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers. *Journal of Infection and Public Health* 13 (2020) 58–67.
4. Djenane D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods* 2015;4:208–28, <http://dx.doi.org/10.3390/foods4020208>.
5. Ishaq A.N., Sani D., Abdullahi S.A., Jolayemi K.O., Ebbo A.A., Jatau I.D., & Gadzama I. M.K. (2022). Evaluation of Anticoccidial Activity of *Citrus aurantium* L. Ethanolic Leaf Extract against Experimental *Eimeria tenella* Infection in Broiler Chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* 4 (2022) 100138, <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100138>.
6. Hashemi S.M.B., Amininezhad R., Shirzadinezhad E., Farahani M., & Yousefabad S.H.A. (2016). The antimicrobial and antioxidant effects of *Citrus aurantium* L. flowers (BaharNarang) extract in traditional yoghurt stew during refrigerated storage. *J FoodSafe* 2016;36(2):153–61, <http://dx.doi.org/10.1111/jfs.12222>.
7. Jing Y., Yuan Y., Monson M., Wang P., Mu F., Zhang Q., Na W., Zhang K., Wang

- Y., Leng L., Li Y., Luan P., Wang N., Guo R., Lamont S.J., Li H. & Yuan H. (2022). Multi-Omics Association Reveals the Effects of Intestinal Microbiome–Host Interactions on Fat Deposition in Broilers. *Front. Microbiol.* 12:815538. doi: 10.3389/fmicb.2021.815538.
8. Kumar S., Cheng X., Klimasauskas S., Mi S., Posfai J., Roberts R.J. & Wilson G.G. (1994). The DNA (cytosine-5). methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol. 22, No. 1 1-10.
 9. Lee I. & Suzuki C.K. (2008). Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May; 1784(5): 727–735.
 10. Martin-Gallausiaux C., Larraufie P., Jarry A., Béguet-Crespel F., Marinelli L., Ledue F., Reimann F., Blottière H.M. & Lapaque N. (2018). Butyrate Produced by Commensal Bacteria Down-Regulates Indolamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO-1) Expression via a Dual Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 9:2838. doi: 10.3389/fimmu.2018.02838.
 11. Parker B.J., Wearsch P.A., Veloo A.C.M., & Rodriguez-Palacios A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front. Immunol.* 11:906. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906.
 12. Pellati F., Benvenuti S., Melegari M., & Firenzuoli Fm (2002). Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *Amara*, *J Pharm Biomed Anal* 29 (6) (2002) 1113–1119 2002 .
 13. Qiu K., Wang X., Zhang H., Wang J., Qi G., & Wu S. (2022). Dietary Supplementation of a New Probiotic Compound Improves the Growth Performance and Health of Broilers by Altering the Composition of Cecal Microflora. *Biology* 2022, 11, 633. <https://doi.org/10.3390/biology11050633>.
 14. Rios-Covian D., Salazar N., Gueimonde M. & de los Reyes-Gavilan C.G. (2017) Shaping the Metabolism of Intestinal *Bacteroides* Population through Diet to Improve Human Health. *Front. Microbiol.* 8:376. doi: 10.3389/fmicb.2017.00376.
 15. Rodionov D.A., Hebbeln P., Gelfand M.S., & Eitinger T (2006). Comparative and Functional Genomic Analysis of Prokaryotic Nickel and Cobalt Uptake Transporters: Evidence for a Novel Group of ATP-Binding Cassette Transporters. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Jan. 2006, p. 317–327.
 16. Segneanu A.E., Velciov S.M., Olariu S., Cziple F., Damian D., Grozescu I. Bioactivemolecules profile from natural compounds. In: Asao T, Asaduzzaman M, editors. *Amino acid—new insights and roles in plant and animal*. IntechOpen; 2017. p.209–28, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68643>.
 17. Sugimura N., Li Q., Chu E.S.H., Lau H.C.H., Fong W., Liu W., Liang C., Nakatsu G., Su A.C.Y., Coker O.O., Wu V.K.K., Chan F.K.L., & Yu J. (2021). *Lactobacillus gallinarum* modulates the gut microbiota and produces anti-cancer metabolites to protect against colorectal tumourigenesis. *Gut* 2021;0:1–11. doi:10.1136/gut-jnl-2020-323951.
 18. Suntar I., Khan H., Patel S., Celano R., & Rastrelli K., (2018). An Overview on *Citrus aurantium* L: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent, *Oxidat Med Cell Long* (2018) 101155/2018/7864269.

EPIDEMIA ITALIANA DI HPAI H5N1 CLADE 2.3.4.4B (2021-2022): INFEZIONE SILENTE IN UN ALLEVAMENTO INDUSTRIALE DI BROILER

Gobbo F.¹, Zanardello C.¹, Bottinelli M.¹, Budai J.¹, Bruno F.¹, De Nardi R.², Patregnani T.², Catania S.¹, Terregino C.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.;*

²*Servizio Veterinario Azienda Ulss 9 SCALIGERA, via Valverde, 42, 37122 Verona, Italia .*

Summary

From October 2021 to January 2022, different incursions of clade 2.3.4.4b H5N1 HPAIV (Highly Pathogenic Avian Influenza Virus) occurred in several Italian regions with its main diffusion in Densely Poultry Populated Areas (DPPAs) of northeastern Italy. Monitoring and control activities applied in the affected area clearly evidenced that turkeys and broilers were the most affected species, although several flocks of broilers at times resolved HPAIV H5N1 infection in absence of increased mortality and/or clinical signs. Thus, an approach based on sampling dead birds was adopted in the broiler sector to improve the early detection of infection; this protocol allowed us to confirm 15 farms being HPAIV infected with birds ready to be delivered to the slaughterhouse. The aim of this report is to describe the results of the diagnostic activities carried out in one HPAIV H5N1 infected broiler farm, three days after laboratory confirmation during the pre-movement testing without showing increased mortality or clinical signs. Thus, clinical signs, daily cumulative mortality rate (CMR), virus shedding, seroconversion, pathobiology of clade 2.3.4.4b H5N1 HPAIV as well as AIVs (Avian Influenza Viruses) environmental contamination were thoroughly examined in the infected holding. Such in-depth investigation demonstrated low infection prevalence in live birds, low environmental contamination, no seroconversion for AIVs, gross and microscopic findings compatible with systemic infection with peracute death in H5N1 HPAIV infected birds.

INTRODUZIONE

Durante gli anni 2021-2022 in Europa si sta osservando una delle più gravi epidemie di influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) con coinvolgimento di avifauna selvatica, uccelli tenuti in cattività e pollame. Tutti i focolai sono stati attribuiti al virus HPAI sottotipo H5 clade 2.3.4.4b, che attualmente risulta il lineaggio maggiormente diffuso a livello globale (Eurasia, Africa, Nord America). Alcuni di questi isolati virali hanno un potenziale zoonotico, testimoniato da marcatori genetici che indicano un crescente adattamento ai mammiferi e da numerose segnalazioni di infezione con questo patogeno in diverse specie di mammiferi selvatici e nell'uomo (EFSA, 2022). Da ottobre 2021 a gennaio 2022, il territorio italiano è stato colpito da diverse incursioni del clade 2.3.4.4b H5N1 HPAIV sia nell'avifauna selvatica sia domestica. Il cluster più importante di infezione è stato registrato in Veneto, territorio geografico caratterizzato da una peculiare combinazione di *Densely Poultry Populated Areas* (DPPAs) e zone umide e quindi considerato a più alto rischio di introduzione di HPAIV attraverso gli uccelli acquatici migratori. Il 18 ottobre 2021, il primo focolaio ad alta patogenicità H5N1 clade 2.3.4.4b si è verificato

in un allevamento industriale di tacchini da carne, situato nel “core” della DPPA della provincia di Verona. Nonostante le autorità sanitarie abbiano immediatamente adottato numerosi provvedimenti volti a mitigare urgentemente la diffusione dell’infezione da HPAI (abbattimento degli animali infetti, Zona di Protezione *ZP*, Zona di Sorveglianza *ZS* e Zona di ulteriore Restrizione *ZUR*), un gran numero di focolai secondari sono stati osservati con una distribuzione centripeta rispetto al primo focolaio (*Index Case*) in tutte le principali categorie avicole della regione Veneto. Le successive attività di monitoraggio e controllo applicate durante l’emergenza epidemica nell’area colpita da HPAI H5N1 hanno chiaramente evidenziato che i tacchini e i polli da carne sono state le specie più colpite. Durante l’epidemia italiana segni clinici e aumento della mortalità sono stati riportati in tacchini, ovaiole, anatre commerciali, faraone, quaglie e fagiani, mentre nella categoria broiler numerosi focolai sono stati confermati solo grazie alle attività di monitoraggio attivo e in assenza di significativo aumento della mortalità giornaliera, di sintomatologia sospetta o di alterazione dei parametri produttivi. Inoltre i risultati laboratoristici di tali attività sanitarie hanno permesso di evidenziare che i tamponi orofaringei e/o tracheali campionati da broiler vivi in azienda presentavano una minore frequenza di campioni positivi e/o una minore carica virale (Ct) se comparati con le altre categorie produttive infette (tacchino, ovaiole, faraona e quaglia). Queste evidenze di campo e di laboratorio hanno quindi portato all’emanazione di controlli più approfonditi nell’intero settore avicolo con test virologici obbligatori su tutti i volatili morti presenti in azienda e specificatamente per il settore broiler un protocollo per la movimentazione al macello includente visita clinica e raccolta di 60 tamponi orofaringei/tracheali da ogni capannone dell’allevamento in animali vivi (concentrandosi su eventuali soggetti sintomatici o malati) e tampone tracheale obbligatorio da tutti i volatili morti di giornata o dei giorni precedenti il carico. Tali misure combinate si sono rivelate efficaci nella *detection* tra ottobre e dicembre 2021 del virus H5N1 HPAI in 15 gruppi di polli da carne asintomatici su 961 esaminati (2%) e pronti per il carico per il macello. Inoltre sette di questi focolai (1%) sono stati confermati positivi per IA solo grazie ai risultati dei test di laboratorio effettuati su volatili morti. Successivamente, da gennaio 2022 fino alla fine dell’ondata epidemica (marzo 2022), nessun gruppo di broiler (0% su un totale di 1206 testati) è risultato positivo per IA durante i test pre-movimentazione. Lo scopo del presente lavoro è descrivere i risultati delle attività diagnostiche svolte in un allevamento commerciale di broiler dopo 72 ore dalla conferma laboratoristica di positività per HPAIV H5N1 in uno dei due capannoni testati in pre-movimentazione e in assenza di aumento di mortalità, segni clinici o alterazione di parametri produttivi.

MATERIALI E METODI

Il giorno del sopralluogo (3 giorni dalla conferma diagnostica di HPAI) l’allevamento infetto presentava un totale di 26.271 animali di 8 settimane allevati in due capannoni: il capannone 1, considerato infetto, e il capannone 3. In entrambi i capannoni erano presenti soggetti maschi, poiché lo sfoltimento delle femmine per l’invio al macello era avvenuto circa una settimana prima. Si è provveduto ad eseguire in entrambi i capannoni una scrupolosa visita clinica per evidenziare segni di malattia, sintomatologia sospetta e valutare il comportamento degli animali (assunzione di alimento ed acqua). I dati di mortalità cumulativa dell’intero ciclo produttivo sono stati messi a disposizione e registrati per la loro elaborazione. In entrambi i capannoni si è eseguito un campionamento randomizzato di tamponi tracheali (TT) e cloacali (TC) da animali vivi (60 animali nel

cap. 1; 40 animali nel cap. 3) per valutazione dello *shedding* virale in Real-Time RT-PCR, inoltre si sono eseguiti prelievi di sangue per valutazione della sieroconversione per influenza aviaria (IA) tramite metodica ELISA in 65 sieri di animali vivi (35 sieri animali cap. 1; 30 animali cap. 3).

Le carcasse disponibili nei due capannoni (un animale moribondo e quattro carcasse nel cap. 1 e cinque carcasse nel cap. 3) sono state raccolte ed inviate al laboratorio per esame autoptico, prelievo di siero da coagulo cardiaco per valutazione della sieroconversione per IA e prelievo in doppia aliquota di trachea, polmone, milza, duodeno, pancreas, tonsille cecali, Borsa di Fabrizio e cervello per lo studio del tessuto-tropismo in Real-Time RT-PCR e patobiologia dell'infezione HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b nel broiler (esame istologico E-E e immunostochimica IHC).

In fine durante il sopralluogo sono stati eseguiti anche dei campionamenti ambientali, quali tamponi a secco da superfici inanimate (manici delle carriole, maniglie e ruote dall'auto di servizio dell'IZSVE) e sovrascarpe per la valutazione in Real-Time RT-PCR della contaminazione ambientale di HPAIV H5N1 nella azienda infetta.

RISULTATI

Durante la visita clinica del capannone 1 e 3 la maggior parte degli animali presentavano buone condizioni generali e normale comportamento alimentare in assenza di conclamata sintomatologia respiratoria, gastroenterica o neurologica. In alcuni animali si sono rilevati segni di dermatite-cellulite cutanea e/o bursiti sternali e solamente nel capannone 1-infetto pochi animali presentavano lievi e a specifici sintomi respiratori (congiuntivite, rantoli, essudazione nasale) o ali cadenti con piumaggio arricciato. L'elaborazione dei dati di mortalità cumulativa (CMR) ha dimostrato che, fatta eccezione per episodi di mortalità anomala nei primi giorni post accasamento, in entrambi i capannoni non si è mai registrata una mortalità giornaliera superiore allo 0.2% durante l'intero ciclo produttivo. I risultati dell'indagine epidemiologica (IE) hanno rilevato marcato incremento della mortalità solo dopo 8 giorni dalla notifica del focolaio. Lo studio di *shedding* virale tramite l'analisi dei tamponi tracheali e cloacali ha dimostrato l'assenza di eliminazione virale in tutti i tamponi prelevati dai 40 animali del capannone 3 (0%), e al contrario la presenza di genoma virale in trachea e/o cloaca di 12 broiler su 60 esaminati del capannone 1 infetto (20%). Il totale dei 65 sieri collezionati negli animali vivi (35 sieri nel cap. 1 e 30 sieri nel cap. 3), così come i sieri ematici ottenuti dal coagulo cardiaco delle 10 carcasse non ha rilevato alcuna sieroconversione per IA. Le lesioni macroscopiche con conferma anche in sede istopatologica (E-E) delle 5 carcasse del capannone 1-infetto erano comparabili tra i diversi soggetti e maggiormente distribuite all'apparato respiratorio con segni di congiuntivite sierosa con congestione della mucosa, tracheite sierosa o siero-cattarale con iperemia diffusa della mucosa e grave edema e congestione del parenchima polmonare. Inoltre tutti i soggetti esaminati presentavano marcata splenomegalia associata a diffuse e miliari lesioni biancastre (necrosi) del parenchima. Le borse di Fabrizio si presentavano di dimensioni consistenti con mucosa lievemente edematosa e le tonsille cecali presentavano segni di iperplasia con focali petecchie emorragiche in alcuni soggetti. Tra le cinque carcasse esaminate del capannone 3 solo una ha presentato lesioni macroscopiche e microscopiche sovrapponibili a quelle sopra descritte per gli animali infetti (Tabella 2; BRL 4). I risultati dell'esame immunostochimico (IHC) sulle sezioni degli organi infetti ha dimostrato la presenza dell'antigene virale in cellule epiteliali, endotelio, macrofagi e nel cervello (cellule neuronali e gliali). Si riportano nelle

due tabelle sottostanti i risultati integrati dello studio di tessuto tropismo in Real-Time RT-PCR e di patobiologia dell'infezione HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b nelle carcasse di broiler del capannone 1 e 3.

Tabella 1: risultati dello studio di tessuto tropismo e patobiologia dell'infezione da HPAI H5N1 nei volatili morti del capannone 1

Capannone 1	BRL1		BRL2		BRL3		BRL4		BRL5		Cellule IHC positive/tessuto
Organo	rRT-PCR (Ct)	IHC score									
Polmone	17.6	+++	34.01	-	21.06	+++	18.77	+++	18.43	+++	Pneumociti, endotelio
Trachea	18.9	+	27.89	-	21.67	++	21.96	++	19.77	+++	Cellule epiteliali, endotelio e macrofagi
Milza	19.07	+	36.13	-	19.81	+++	22.08	++	23.32	++	Macrofagi ed endotelio
Duodeno	18.35	++	31.32	-	22.39	+	21.36	+	20.09	+++	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, endotelio e plessi
Pancreas	17.17	+++	33.57	-	22.19	++	22.21	+	18.73	+++	Epitelio della componente acinare
Tonsille cecali	16.81	+++	25.32	+	neg	n.e.	22.46	++	18.29	++	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, aree di necrosi ed endotelio
Borsa di Fabrizio	18.19	+++	32.91	-	20.25	+	21.71	++	15.15	++	Macrofagi
Cervello	13.85	+++	34.6	-	19.83	++	17.2	+++	18.94	+++	Neuroni, cellule della glia e ependimali

BRL, broiler; rRT-PCR, Real-Time RT-PCR; Ct, cycle threshold; IHC score, - (negativo), -/+ (rara/occasionale presenza di cellule IHC positive), ++ (bassa presenza di cellule IHC positive), +++ (/moderata presenza di cellule IHC positive), ++++ elevata presenza di cellule IHC positive), +++++ diffusa presenza di cellule IHC positive); neg, negativo; n.e., non eseguito.

Tabella 2: risultati dello studio di tessuto tropismo e patobiologia dell'infezione da HPAI H5N1 nei volatili morti del capannone 3

Capannone 3	BRL1		BRL2		BRL3		BRL4		BRL5		
Organo	rRT-PCR (Ct)	IHC score	Cellule IHC positive/tessuto								
Polmone	neg	-	neg	n.e.	neg	n.e.	25.03	-/+	39.43	-	Pneumociti, endotelio
Trachea	37.68	-	neg	n.e.	neg	n.e.	23.83	+	38.46	-	Cellule epiteliali, endotelio e macrofagi
Milza	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	23.86	-/+	neg	n.e.	Macrofagi ed endotelio
Duodeno	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	25.03	-/+	neg	-	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, endotelio e plessi
Pancreas	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	24.03	-/+	38.31	-	Epitelio della componente acinare
Tonsille cecali	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.a.	24.05	+	neg	n.e.	<i>Cellular debris</i> delle cripte, epitelio, aree di necrosi ed endotelio
Borsa di Fabrizio	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.a.	22.25	-	neg	n.a.	Macrofagi
Cervello	neg	n.e.	neg	n.e.	neg	n.e.	19.88	+	neg	n.e.	Neuroni, cellule della glia e ependimali

BRL, broiler; rRT-PCR, Real-Time RT-PCR; Ct, cycle threshold; IHC score, - (negativo), -/+ (rara/occasionale presenza di cellule IHC positive), ++ (bassa presenza di cellule IHC positive), +++ (/moderata presenza di cellule IHC positive), ++++ elevata presenza di cellule IHC positive), +++++ diffusa presenza di cellule IHC positive); neg, negativo; n.e., non eseguito; n.a., non applicabile.

Infine, la valutazione della contaminazione ambientale per IA tramite metodica Real-Time RT-PCR ha mostrato blande positività (> 36.00 Ct) unicamente su matrici ambientali del capannone 1-infetto (2 pool/3 di sovrascarpe e dal tampone eseguito sui manici della carriola utilizzata per i campionamenti del presente studio; al contrario nessun campione ambientale collezionato nel capannone 3 ha mostrato positività in Real-Time RT-PCR. Questi risultati suggeriscono quindi una bassa contaminazione ambientale di HPAIV H5N1 nell'azienda infetta di broiler con infezione silente.

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio hanno consentito di acquisire un quadro più completo riscontrabile in casi di infezione silente con HPAIV H5N1 clade 2.3.4.4b nel broiler dimostrando una bassa prevalenza negli animali vivi e la maggiore efficienza di diagnosi di IA (*early detection*) attraverso test di laboratorio eseguiti su matrici biologiche prelevate da volatili morti. In questo allevamento, i dati di mortalità cumulativa o la clinica non si sono rivelati efficaci per il sospetto precoce (*early warnig*) di HPAI, infatti la mortalità anomala si è osservata solo dopo 8 giorni dalla notifica del focolaio in entrambi i capannoni. Questi dati combinati con la dinamica temporale di infezione del capannone 3 suggeriscono che l'introduzione in azienda del HPAIV sia avvenuto almeno 11 giorni prima dell'insorgenza di sintomatologia sospetta e dell'incremento significativo della mortalità. Il capannone 3 è stato considerato infetto solo grazie alle analisi condotte sulle carcasse poiché sulla base del campionamento *intra vitam* tutti i 40 soggetti esaminati sono risultati negativi per IA sia da tamponi tracheali sia cloacali. Al contrario, le carcasse risultate infette da HPAIV hanno dimostrato una infezione di natura sistemica con elevate cariche virali e mortalità iperacuta per *failure* multi-organo. I risultati delle indagini sierologiche hanno evidenziato l'assenza di sieroconversione in ELISA in tutti gli animali vivi e nelle carcasse esaminate, sottolineando come la sierologia non possa risultare uno strumento utile nelle attività di sorveglianza per HPAI nel settore broiler. I dispositivi emanati durante l'epidemia italiana di HPAI H5N1 e lo specifico protocollo adottato per il settore broiler (*weekly pool sampling "bucket sampling" in poultry species that often do not manifest clinical signs when infected with HPAI*: <https://www.izsvenezie.com/documents/reference-laboratories/avian-influenza/diagnostic-protocols/weekly-pool-sampling-bucket-sampling.pdf>) si sono confermati efficaci nella diagnosi precoce di infezione con HPAI in gruppi di broiler in assenza di sintomatologia o incremento della mortalità, consentendo di non movimentare attraverso le DPPAs della regione Veneto migliaia di animali potenzialmente infetti.

CONCLUSIONI

L'evidenza di campo dell'infezione silente in alcuni allevamenti di broiler durante l'epidemia italiana di HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b e i risultati ottenuti in questo studio sottolineano l'importanza di promuovere costanti studi sull'evoluzione degli HPAIV circolanti e di valutare attentamente il loro comportamento nelle diverse categorie avicole, al fine di ottenere evidenze scientifiche sul loro potenziale ruolo epidemiologico e per mettere in atto le più efficienti strategie di controllo e sorveglianza.

BIBLIOGRAFIA

1. Gobbo, F.; Zanardello, C.; Bottinelli, M.; Budai, J.; Bruno, F.; De Nardi, R.; Patregnani, T.; Catania, S.; Terregino, C. Silent Infection of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b in a Commercial Chicken Broiler Flock in Italy. *Viruses* 2022, 14, 1600. <https://doi.org/10.3390/v14081600>
2. Lee, D. H.; Bertran, K.; Kwon, J. H.; Swayne, D.E. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3. 4.4. *J Vet Sci* 2017, 18(S1), 269-280. doi.org/10.4142/jvs.2017.18.S1.269
3. Adlhoch, C.; Fusaro, A.; Gonzales, J.L.; Kuiken, T.; Marangon, S.; Niqueux, E.; Staubach, C.; Terregino, C.; Aznar, I.; Guajardo, M.I.; Baldinelli, F. European

- Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention, Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Avian influenza overview December 2021–March 2022. *EFSA J.* 2022, 20(4), e07289. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7289>
4. Gobbo, F.; Fornasiero, D.; De Marco, M.A.; Zecchin, B.; Mulatti, P.; Delogu, M.; Terregino, C. Active Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Wintering Waterbirds in Northeast Italy, 2020-2021. *Microorganisms* 2021, 20;9(11):2188. [doi:10.3390/microorganisms9112188](https://doi.org/10.3390/microorganisms9112188)
 5. Beerens, N.; Germeraad, E.A.; Venema, S.; Verheij, E.; Pritz-Verschuren, S.B.; Gonzales, J.L. Comparative pathogenicity and environmental transmission of recent highly pathogenic avian influenza H5 viruses. *Emerg Microbes Infect* 2021, 10(1), 97-108. doi.org/10.1080/22221751.2020.1868274
 6. Perlas, A.; Argilaguët, J.; Bertran, K.; Sánchez-González, R.; Nofrarías, M.; Valle, R.; Ramis, A.; Cortey, M.; Majó, N. Dual Host and Pathogen RNA-Seq Analysis Unravels Chicken Genes Potentially Involved in Resistance to Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection. *Front Immunol* 2021, 12. doi.org/10.3389/fimmu.2021.800188

STRATEGIA DI DIFFERENZIAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DA CEPPI DI CAMPO DEL VIRUS DELL'INFLUENZA (SOTTOGRUPPO H5) E DA VACCINI RICOMBINANTI

Lesceu S., Gaimard M., Redal C., Drus J-E., Lefebvre C., Pourquier P.

Innovative Diagnostics, 310 Rue Louis Pasteur, 34790 Grabels, Francia

Summary

The Influenza A virus is at the origin of infections in both humans and animals and can lead to more or less serious forms depending on the strain. In order to control outbreaks and avoid massive culling as well as significant economic losses for farmers, vaccination of the flocks is becoming more and more essential given the epidemiology of H5 HPAI worldwide.

Vaccination with recombinant vaccines is increasingly developed. That is why IDvet has chosen to develop tools able to differentiate the antibodies developed after an infection by a field strain from the antibodies elicited by vaccination of the animals.

INTRODUZIONE

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* e infettano sia l'uomo che una varietà di ospiti animali. Esistono quattro tipi di virus influenzali: A, B, C e D, definiti dalla natura dell'antigene del nucleocapside interno. Il tipo A è quello più conservato e può essere ulteriormente suddiviso in sottotipi in base agli antigeni emoagglutinina (H) e neuraminidasi (N). Sono stati isolati diciotto antigeni H (da H1 a H18) e undici antigeni N (da N1 a N11). La maggior parte dei virus dell'influenza aviaria (sottotipi da H1 a H18) sono a bassa patogenicità, come l'H9, e sono generalmente coinvolti in coinfezioni con altri virus aviari, che possono portare a importanti perdite negli allevamenti di pollame. Alcuni sottotipi contenenti H5 e H7 sono associati a forme altamente patogene della malattia, con un alto tasso di mortalità.

La vaccinazione è uno strumento essenziale per il controllo delle malattie del pollame e per molti anni sono stati utilizzati vaccini convenzionali. Oggi, le innovazioni nella vaccinologia avicola includono vaccini immunocomplessi e vaccini vettoriali. I vantaggi associati a questi ultimi includono la biosicurezza, l'efficienza, la capacità di creare un'immunità passiva e l'immunità di lunga durata. Negli ultimi 5 anni, le ondate successive di influenza in Europa hanno spinto le autorità sanitarie a rivedere la loro strategia di vaccinazione contro questo virus, e oggi, in particolare, contro il virus H5 in Europa. Attualmente è necessario sviluppare il vaccino anti-influenzale ideale per affrontare questa malattia. Diversi studi hanno dimostrato l'efficacia di vaccini vettoriali contro l'IA con l'inserimento dell'emoagglutinina (HA) H5 [2], [3], H7 [4] e H9 [5] in un vettore HVT.

Poiché attualmente esistono alcuni vaccini candidati H5, IDvet ha sviluppato un nuovo test ELISA, l'**ID Screen® Influenza H5 Indirect**, basato sulla proteina H5. Questo kit è uno strumento eccellente per il monitoraggio dei vaccini convenzionali e ricombinanti e anche per l'implementazione di strategie DIVA: gli animali

vaccinati possono essere monitorati con questo nuovo kit e gli animali naturalmente infetti possono essere individuati con l'**ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect**.

MATERIALI E METODI

Studio della specificità del kit FLUH5S

L'esclusività è stata studiata utilizzando 2 diversi pannelli influenzali:

- Uno proveniente da GD Deventer: sono stati analizzati 2 diversi ceppi H5 (H5N2 e H5N3) e i sottotipi H6, H7 e H9.
- Un secondo proveniente dal Friedrich-Loeffler-Institut (FLI). Sono stati analizzati i seguenti ceppi: H2N5, H2N9, H3N1, H5N2, H5N3, H6N2, H7N1, H7N7, H10N4 e H11N6.

In secondo luogo, per determinare la specificità diagnostica del test FLUH5S ELISA, sono stati analizzati 320 sieri di volatili SPF (origine: Francia) e 100 sieri di polli da carne esenti da malattia (origine: Ungheria).

Monitoraggio dei volatili vaccinati con Vectormune AI (rHVT-AI(H5))

Le galline ovaiole sono state vaccinate con il vaccino ricombinante Vectormune AI rHVT-H5 (da Ceva Santé Animale) a un giorno di età e in seguito inoculate a 55 settimane di età con il ceppo H5N8 del virus influenzale. I titoli anticorpali sono stati valutati utilizzando l'**ID Screen® Influenza H5 Indirect** ELISA (codice prodotto = FLUH5S) e l'**ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect** (codice prodotto = FLUNPS). In parallelo, il test HI è stato eseguito da CEVA PHYLAXIA utilizzando il ceppo HPAIV H5N8 (A/Belgium/chicken/U1700807 PTL807/2017). I campioni di sangue sono stati prelevati dagli animali a 55 e 57 settimane, ovvero 2 settimane dopo il l'inoculo. Sono stati calcolati i titoli medi, minimi, massimi e il CV%.

Monitoraggio dei volatili vaccinati con il vaccino H5 RNA

I polli SPF sono stati vaccinati a 1 giorno e a 4 settimane di età con un vaccino H5 RNA (da Ceva Santé Animale) ed in seguito inoculati a 6 settimane di età con il ceppo H5N8 del virus influenzale. I titoli anticorpali sono stati valutati utilizzando l'**ID Screen® Influenza H5 Indirect** ELISA (codice prodotto = FLUH5S) e l'**ID Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect** (codice prodotto = FLUNPS). In parallelo, è stato eseguito anche il test HI utilizzando il ceppo HPAIV H5N8 (ceppo Belgium 2017 A/Brahma chicken/Belgium/6153/2017). I campioni di sangue sono stati prelevati dagli animali a 3, 4, 5, 6 e 8 settimane di età. Sono stati calcolati i titoli medi, minimi, massimi e il CV%.

Questa parte dello studio è stata effettuata da Sciensano (Belgio).

RISULTATI

Studio della specificità del kit FLUH5S

Le tabelle seguenti mostrano i risultati ottenuti per i diversi sottotipi testati da GD DEVENTER (Tabella 1) o FLI (Tabella 2):

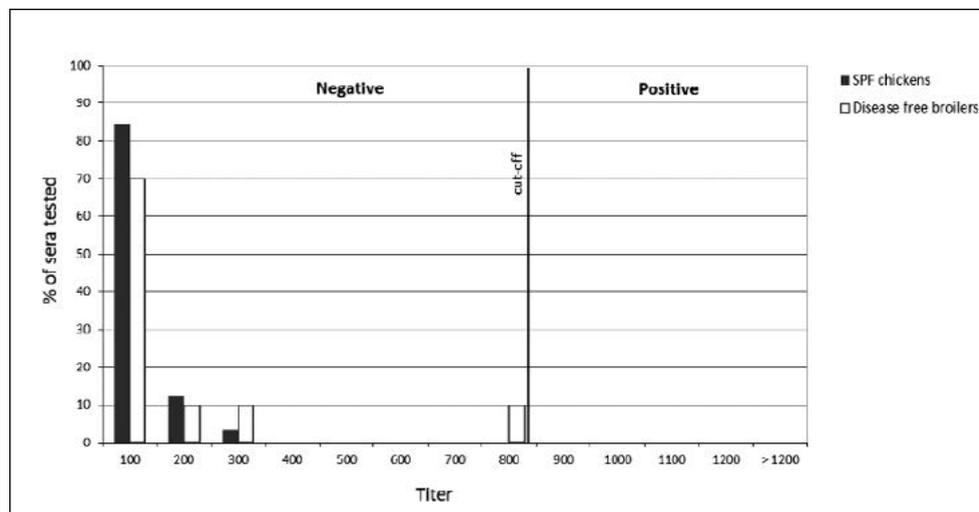
Tabella 1: Esclusività relativa al pannello
Influenza di GD DEVENTER

	Risultati con il kit FLUH5S
H2N5	-
H2N9	-
H3N1	-
H5N2	+
H5N3	+
H6N2	-
H7N1	-
H7N7	-
H10N4	-
H11N6	-

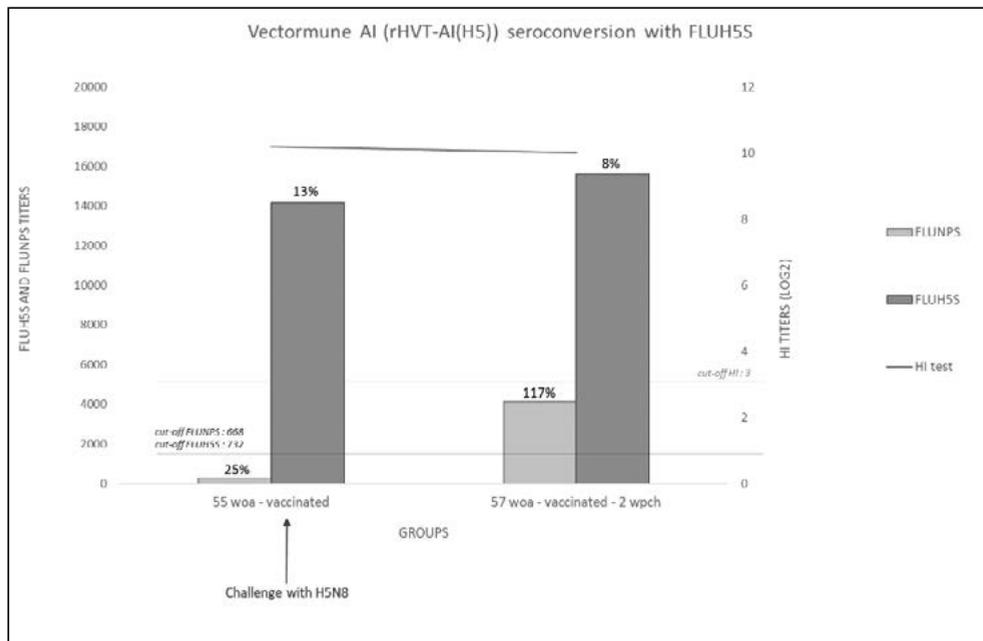
Tabella 2: Esclusività relativa al pannello
influenza di FLI

	Risultati con il kit FLUH5S
H5N2 (VLDIA 042)	+
H5N8 (VLDIA 250)	+
H6 (VLDIA 131)	-
H7 (VLDIA 098)	-
H9 (VLDIA 113)	-

Figura 1: Specificità misurata con il kit FLUH5S = 100% (CI_{95%}: 99,09% - 100%), n=420.



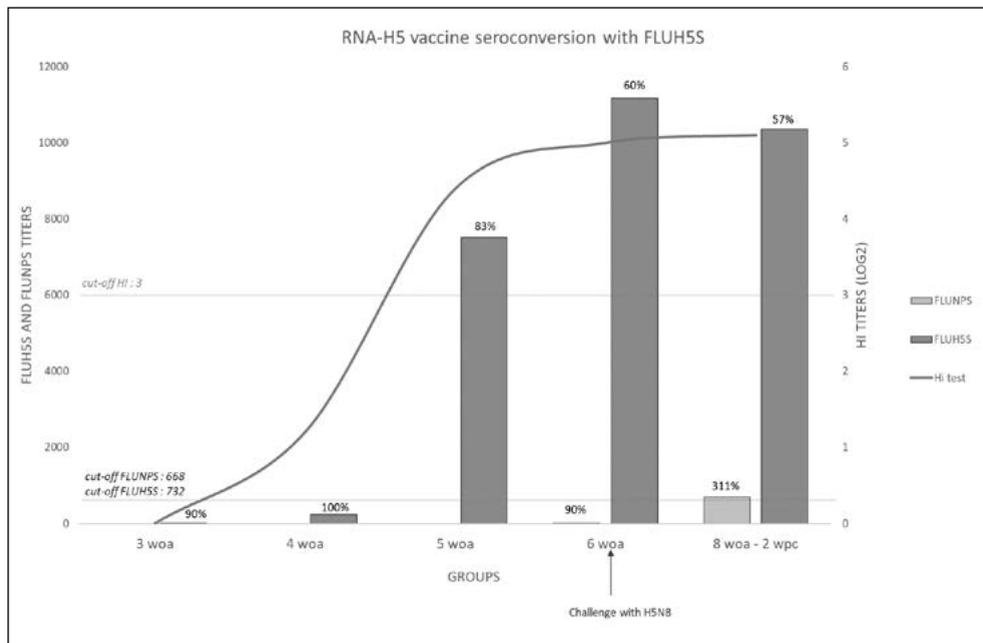
Monitoraggio dei volatili vaccinati con Vectormune AI (rHVT-AI(H5))
 I risultati sono riportati di seguito (Figura 2):



Età del gruppo	55 settimane		57 woa settimane	
	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S
Kit ELISA				
Titolo medio	280	14158	4124	15633
CV%	25	13	117	8
%POS	0	100	80	100

Figura 2: Distribuzione del titolo dopo la vaccinazione con un vaccino ricombinante rHVT-H5 con i kit ELISA FLUH5S e FLUNPS di IDvet e con il test HI.

Monitoraggio dei volatili vaccinati con il vaccino H5 RNA
I risultati sono riportati di seguito (Figura 3):



Età del gruppo	3 settimane		4 settimane		5 settimane		6 settimane		8 settimane – 2 settimane post-inoculo	
	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S	FLUNPS	FLUH5S
Titolo medio	/	11	/	244	/	7514	12	11168	701	10350
CV%	/	90	/	100	/	83	90	60	311	57
%POS	/	0	/	0	/	90	0	100	10	100

Figura 3: Distribuzione del titolo dopo la vaccinazione con un vaccino a RNA H5 con i kit FLUH5S e FLUNPS ELISA di IDvet e con il test HI.

DISCUSSIONE

Dal momento che gli studi relativi a infezioni di campo sono ancora in corso, l’obiettivo principale di questo lavoro è quello di presentare i concetti generali di DIVA, nonché l’efficacia degli strumenti basati sui primi risultati di studi sperimentali, senza concentrandosi sui valori esatti del titolo attesi.

Studio della specificità del kit FLUH5S

I risultati mostrano che il kit FLUH5S è molto specifico per l’emoagglutinina H5, senzareazioni incrociate con altri sottotipi di influenza.

Inoltre, la specificità diagnostica di questo kit è risultata eccellente sui campioni SPF e sul pannello di campioni provenienti da animali esenti da malattia, con il 100% di negatività al test.

Monitoraggio dei volatili vaccinati con Vectormune AI (rHVT-AI(H5))

I risultati mostrano che il kit FLUH5S è in grado di rilevare gli anticorpi sviluppati dopo la vaccinazione con vaccino ricombinante. Infatti, per i gruppi di 55 e 57 settimane di età, si ottengono titoli medi di circa 15 000 (il cut-off del kit è 732).

I risultati mostrano anche che il kit FLUH5S consente di monitorare la vaccinazione con una buona correlazione con il test HI.

D'altro canto, il kit FLUNPS può essere utilizzato come parte della strategia DIVA: negli animali sottoposti a challenge a 55 settimane di età, gli anticorpi sviluppati a causa del contatto con il ceppo di campo sono rilevabili 2 settimane dopo, con un titolo medio di circa 4000 (il cut-off del kit è 668).

Monitoraggio dei volatili vaccinati con vaccino H5 RNA - RISULTATI SCIENSANO

Gli animali sono stati vaccinati a 1 giorno di età e poi a 4 settimane di età con il vaccino H5 RNA. I risultati mostrano chiaramente che il kit FLUH5S è in grado di rilevare gli anticorpi sviluppati dopo doppia vaccinazione a 1 giorno di età e a 4 settimane di età. A 5 settimane di età, il titolo medio ottenuto con il kit FLUH5S è di circa 8000 e > di 10 000 a 6 e 8 settimane di età.

Come in precedenza, i risultati mostrano anche che il kit FLUH5S consente di monitorare la vaccinazione ricombinante con una buona correlazione con il test HI.

Inoltre, anche in questo caso, il kit FLUNPS può essere utilizzato come parte della strategia DIVA: negli animali sottoposti a challenge a 6 settimane di età, si osserva un aumento a 8 settimane (2 settimane dopo il challenge), con un titolo medio di circa 700 (cut-off = 668).

CONCLUSIONI

I risultati presentati dimostrano che il kit ELISA FLUH5S, che si basa su una proteina H5 ricombinante, è caratterizzato da un'elevata specificità per l'emoagglutinina H5. Questo kit permette anche una rilevazione affidabile degli anticorpi sviluppati dopo vaccinazione con vaccino rHVT-H5 o SRV-H5, presentando una buona correlazione con il test HI. Infine, il kit ELISA FLUH5S può essere utilizzato in associazione con il kit FLUNPS nel contesto di una strategia DIVA, che permette di distinguere gli animali vaccinati con vaccini ricombinanti dagli animali che sono venuti a contatto con un ceppo di campo.

Ringraziamenti: G. Dauphin (Ceva Santé Animale).

BIBLIOGRAFIA

1. S. Reemers, I. Versteegen, S. Basten, W. Hubers, S. Van de Zande. Un vaccino vettore dell'influenza aviaria HVT-H5 ad ampio spettro che induce una rapida insorgenza dell'immunità. *Vaccine*, 39 (7) (2021), pp. 1072-1079, [10.1016/j.vaccine.2021.01.018](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.018)
2. F. Rauw, V. Palya, S. Van Borm, S. Welby, T. Tatar-Kis, Y. Gardin, *et al.* Ulteriori prove della deriva antigenica e dell'efficacia protettiva offerta da un vaccino ricombinante HVT-H5 contro la sfida con due ceppi HPAI H5N1 del clade 2.2.1 egiziano, antigenicamente divergenti. *Vaccine*, 29 (14) (2011), pp. 2590-2600, [10.1016/j.vaccine.2011.01.048](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.048)
3. D.R. Kapczynski, M. Esaki, K.M. Dorsey, H. Jiang, M. Jackwood, M. Moraes,

- et al.* Protezione vaccinale dei polli contro isolati di influenza aviaria altamente patogena H5 antigenicamente diversi con un vaccino vettore HVT vivo che esprime il gene dell'emoagglutinina dell'influenza derivato da un virus dell'influenza aviaria di clade 2.2. *Vaccine*, 33 (9) (2015), pp. 1197-1205, [10.1016/j.vaccine.2014.12.028](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.12.028)
4. Y. Li, K. Reddy, S.M. Reid, W.J. Cox, I.H. Brown, P. Britton, *et al.* Herpesvirus ricombinante dei tacchini come vaccino vettoriale contro l'influenza aviaria H7N1 ad alta patogenicità e la malattia di Marek. *Vaccine*, 29 (46) (2011), pp. 8257-8266, [10.1016/j.vaccine.2011.08.115](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.115)
 5. L. Liu, T. Wang, M. Wang, Q. Tong, Y. Sun, J. Pu, *et al.* Herpesvirus ricombinante di tacchino che esprime l'emoagglutinina H9 e che fornisce protezione contro l'influenza aviaria H9N2. *Virologia*, 529 (2019), pp. 7-15, [10.1016/j.virol.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.01.004)

RIDUZIONE DELL'ABBONDANZA RELATIVA DI *HELICOBACTER PULLORUM* NEL MICROBIOTA CECALE DI POLLI ALLEVATI CON SISTEMA FREE-RANGE

Borrelli L.^{1,3}, Varriale L.¹, Coretti L.^{2,3}, Pace A.¹, Russo T.P.¹, Santaniello A.¹, Gavazzi L.⁴, Lembo F.^{2,3}, Fioretti A.¹, Dipineto L.^{1,3}

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137 Napoli, Italia;

² Dipartimento di Farmacia, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131 Napoli, Italia;

³ TaskForce on Microbiome Studies, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia

⁴ Veterinario Aziendale Gruppo Amadori, Via Del Rio n.400, 47522 San Vittore di Cesena (FC).

Summary

Helicobacter pullorum is recognized as an emerging food-borne pathogen that may colonize the intestinal tract and the liver of avian species and humans causing several gastrointestinal and liver diseases. However, not all strains are reported to be capable of causing clinical disease, thus making poultry as reservoir for the zoonotic transmission of the infection through carcass contamination of broilers at slaughter. In poultry, the prevalence of this bacterium could be underestimated, and the available data mainly refer to conventional rearing systems, whereas free-range and organic breeding have been poorly investigated. Therefore, this study was aimed to characterize the caecal microbiota community of free-range grown chickens and determine the presence and the relative abundance of *H. pullorum* by using NGS-based 16S rDNA sequencing. A total of 18 chickens reared for 56 days on a semi-extensive management system were euthanized at two time points: 9 birds at 28 days of age (before have access to outdoor; I= Indoor) and other 9 birds at 56 days of age (before slaughter; O= Outdoor). Caecal contents were collected for microbiota analyses. *H. pullorum* was detected in the cecum of 16/18 samples and its proportion in indoor was significantly higher than outdoor chickens (2.46% and 0.52%, respectively; $p < 0.05$), showing 78.8% of decrease with the outdoor access of the chickens. Therefore, it may be assumed that the potential for zoonotic infection is less likely. Moreover, *H. pullorum* was negatively correlated with 17 bacterial species as significantly more abundant in Outdoor microbial caecal communities. Among these, we highlighted the presence of *Mucispirillum schaedleri* and *Oscillospira*, already previously associated with a healthy gut and thus representing promising gut bacterial markers for host health. Our findings suggest that alternative production systems with outdoor access, may play a crucial role in the establishment of a healthy gut microbiota, which in turn might prevent colonization of harmful bacteria such as *Helicobacter pullorum*.

INTRODUZIONE

Helicobacter pullorum è una specie enteroepatica di *Helicobacter* (EHS) recen-

temente riconosciuto come un patogeno umano emergente a trasmissione alimentare. Fu descritto per la prima volta da Stanley et al. (1994) nell'uomo e nel pollo e, successivamente, in diverse specie animali tra cui tacchini, faraone, psittacidi, topi e ratti (1). Questo microrganismo Gram-Negativo è stato isolato dall'intestino e dal sistema epatobiliare sia di polli asintomatici che dal fegato e dal contenuto cecale di galline affette da epatite vibrionica (2). Inoltre, *H. pullorum* è stato associato nell'uomo a casi di diarrea, gastroenterite, malattia infiammatoria intestinale, malattia epatobiliare e cancro epatico, sia in soggetti immunocompetenti che immunocompromessi. Il potenziale zoonotico di *H. pullorum* è emerso in seguito al suo isolamento dalla carne di pollo, poiché le carcasse possono essere contaminate con il contenuto cecale durante la macellazione e le diverse procedure di manipolazione. Pertanto, i prodotti a base di carne di pollo, non adeguatamente cotti, costituiscono una delle principali fonti di infezione per l'uomo (1). Allo stato attuale delle conoscenze scientifiche, sono stati caratterizzati pochi meccanismi patogenetici e relativi determinanti molecolari, tuttavia il loro ruolo nell'infezione da *H. pullorum* non è stato ancora del tutto compreso. Studi *in vitro* hanno evidenziato proprietà proinfiammatorie legate alla cytolethal distending toxin (CDT), al lipopolisaccaride (LPS) e all'induzione dell'IL-8 attraverso il pathway NF- κ B delle cellule epiteliali (3). Inoltre, è stato dimostrato che l'infezione da *H. pullorum* attiva i macrofagi dell'ospite e la secrezione di altre citochine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e murine MIP-2), nonché la produzione di ossido nitrico nei macrofagi di topo. Recenti indagini hanno evidenziato in *H. pullorum* il sistema di secrezione di tipo VI come importante fattore di virulenza coinvolto nella patogenesi interagendo con le vescicole endocitiche e innescando l'adesione e l'invasione delle cellule epiteliali intestinali (1). Nonostante l'incremento dei casi clinici riportati, la prevalenza di *H. pullorum* potrebbe essere sottostimata a causa delle diverse caratteristiche fenotipiche in comune con *Campylobacter* spp. e delle particolari esigenze di crescita che ne ostacolano l'isolamento. Nel pollame i tassi di prevalenza presentano un range molto ampio che va dal 4 al 100% a seconda dei metodi di isolamento, del tipo di campione, dell'area geografica e delle pratiche di allevamento (4). Sulla base dell'attuale letteratura scientifica, i dati disponibili si riferiscono principalmente a sistemi di allevamento convenzionali, mentre quelli relativi agli allevamenti free-range e biologici sono molto scarsi. In uno studio condotto in Italia da Manfreda et al. (3), è emerso che nei polli allevati con metodo free-range la prevalenza di *H. pullorum* era significativamente più bassa (i.e., 57%) rispetto a quelli allevati con metodi convenzionali (i.e., 84%) o con il biologico (i.e., 97.4%), anche se resta ancora da chiarire la relazione tra tali risultati e l'influenza di fattori ambientali, dell'età degli animali e della dieta. Poiché le tecniche di allevamento, e in particolare l'utilizzo di antibiotici, possono influenzare la composizione del microbiota cecale del pollo, questo studio ha lo scopo di caratterizzare il microbiota cecale di polli free-range e determinare la presenza e l'abbondanza relativa di *H. pullorum* attraverso il sequenziamento del 16 S rDNA al fine di comprendere meglio l'influenza del microbiota intestinale sulla presenza di tale patogeno. Inoltre, l'identificazione di taxa microbici che possono essere correlati all'assenza o all'aumento della presenza di questo batterio potrebbe fornire nuove informazioni per lo sviluppo di strategie di esclusione competitiva con la

finalità di ridurre la prevalenza di *H. pullorum* nelle specie serbatoio di questo patogeno emergente a trasmissione alimentare.

MATERIALI E METODI

Animali e condizioni di allevamento

Per il presente studio, sono stati selezionati incroci Hubbard (ISA 956) provenienti da un allevamento a marchio certificato del sud Italia. I polli sono stati allevati per 56 giorni con un sistema di gestione semi-estensivo caratterizzato dall'uso di mangimi privi di OGM e dalla totale assenza di antibiotici (dal 29° giorno di età i polli avevano libero accesso alle aree esterne, includendo nella dieta altri elementi vegetali, semi, frutti, insetti e particelle di terreno) e macellati con un peso corporeo medio di 2 Kg. Il mangime, fornito ad libitum, era costituito per il 50-60% da cereali e diverse proporzioni di frumento e soia a seconda del fabbisogno di età (1-28 gg 5% frumento e 30% soia, 29-56 gg 11% frumento e 24% soia), integrato con carbonato di calcio, fosfato bicalcico, cloruro di sodio e bicarbonato di sodio. I vaccini somministrati erano quelli contro la malattia di Newcastle, la bronchite infettiva e la bursite infettiva.

Campionamento

Durante l'intero periodo produttivo (Febbraio- Marzo 2019), un totale di 18 polli sono stati selezionati casualmente in due *time-point*: 9 polli a 28 giorni di età (prima dell'accesso all'esterno; I= Indoor) e altri 9 polli a 56 giorni di età (prima della macellazione; O= Outdoor). Tutti i soggetti sono stati sottoposti a eutanasia per dislocazione cervicale e sezionati in condizioni sterili. Da ciascun cadavere, i ciechi sono stati legati alle due estremità, separati con strumenti sterili dal resto del tratto gastrointestinale, posti in una provetta Falcon sterile da 15 ml e conservati a -80°C.

Sequenziamento del microbiota ed analisi dei dati

Il DNA genomico batterico è stato estratto da circa 0.18 g di contenuto cecale utilizzando il kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore, quantificato al NanoDrop e sottoposto ad elettroforesi in gel d'agarosio allo 0.8%. I campioni di DNA sono stati conservati a -20°C fino alla processazione per l'amplificazione. Le librerie per il sequenziamento delle regioni V3 e V4 sono state preparate secondo il protocollo del 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation for Illumina Miseq System e sequenziate secondo quanto riportato da Borrelli et al. (2017) (5). I dati relativi alle sequenze sono stati importati nel software QIIME2 (v2021.4) per l'analisi (6). Le letture sono state filtrate, tagliate e controllate per le chimere utilizzando il plugin DADA2 (7) che ha generato varianti uniche di ampliconi (ASVs). Successivamente, le ASVs sono state classificate con QIIME2 utilizzando il database SILVA v138 con un classificatore specifico per le regioni amplificate (8). Le differenze tra i gruppi a livello di specie sono state determinate attraverso il test t di Student corretto con il Benjamini-Hochberg *false discovery rate* (FDR). Le correlazioni tra *H. pullorum* e le altre specie batteriche identificate sono state calcolate con l'analisi di correlazione di Spearman.

Inoltre, le interazioni microbiche sono state esplorate generando uno Spearman

co-occurrence network basato sull'abbondanza relativa delle specie risultate significativamente diverse tra i due gruppi, utilizzando il CoNet plugin (9) per Cytoscape (3.9.0) (10) e applicando i seguenti parametri: coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman con una soglia minima di esclusione di 0.6 ($p < 0.05$, con correzione di Bonferroni).

RISULTATI

Dei 18 campioni sequenziati è risultato un totale di 18,473 sequenze assegnate in 3,104 ASVs, con una media di 10,526.28 sequenze per campione (il valore più basso osservato per un campione era di 5,766 sequenze ed il più alto di 14,787 sequenze). L'analisi delle curve di rarefazione ha mostrato che con il numero minimo di 5,766 sequenze/campione è stata ottenuta una buona profondità di sequenziamento e una copertura adeguata delle specie costituenti il microbiota di ciascun campione. La maggior parte delle sequenze (99.87%) erano rappresentate da sequenze batteriche (103,650), seguite da sequenze di Archaea (137 sequenze, 0.13%) ed una sequenza non classificabile (0.001%).

H. pullorum è stato rilevato dal contenuto cecale di 16/18 campioni, con una prevalenza dell'88.9%. La proporzione di *H. pullorum* nel gruppo Indoor si è rivelata significativamente più elevata rispetto al gruppo Outdoor (2.46% e 0.52%, rispettivamente; $p < 0.05$), mostrando una riduzione del 78.8% alla fine del periodo di accesso all'esterno dei polli (Fig.1 A), valore ottenuto calcolando la percentuale media della riduzione di *H. pullorum* nel gruppo Outdoor rispetto al gruppo Indoor.

Inoltre, *H. pullorum* è risultato correlato negativamente con 45 specie batteriche, di cui 22 hanno mostrato un coefficiente di correlazione di Spearman < -0.6 . Successivamente, la comparazione dell'abbondanza relativa ha identificato 17 specie batteriche significativamente più abbondanti (abbondanza relativa $> 0.5\%$) nella comunità microbica cecale del gruppo Outdoor (Fig.1B). In particolare, si evidenzia la comparsa di *Mucispirillum schaedleri* (0% e 1.34% in Indoor e Outdoor, rispettivamente) e del genere *Oscillospira*. Tali risultati suggeriscono che queste specie batteriche possono rappresentare degli specifici competitors di *H. pullorum* acquisiti durante la fase di allevamento all'aperto.

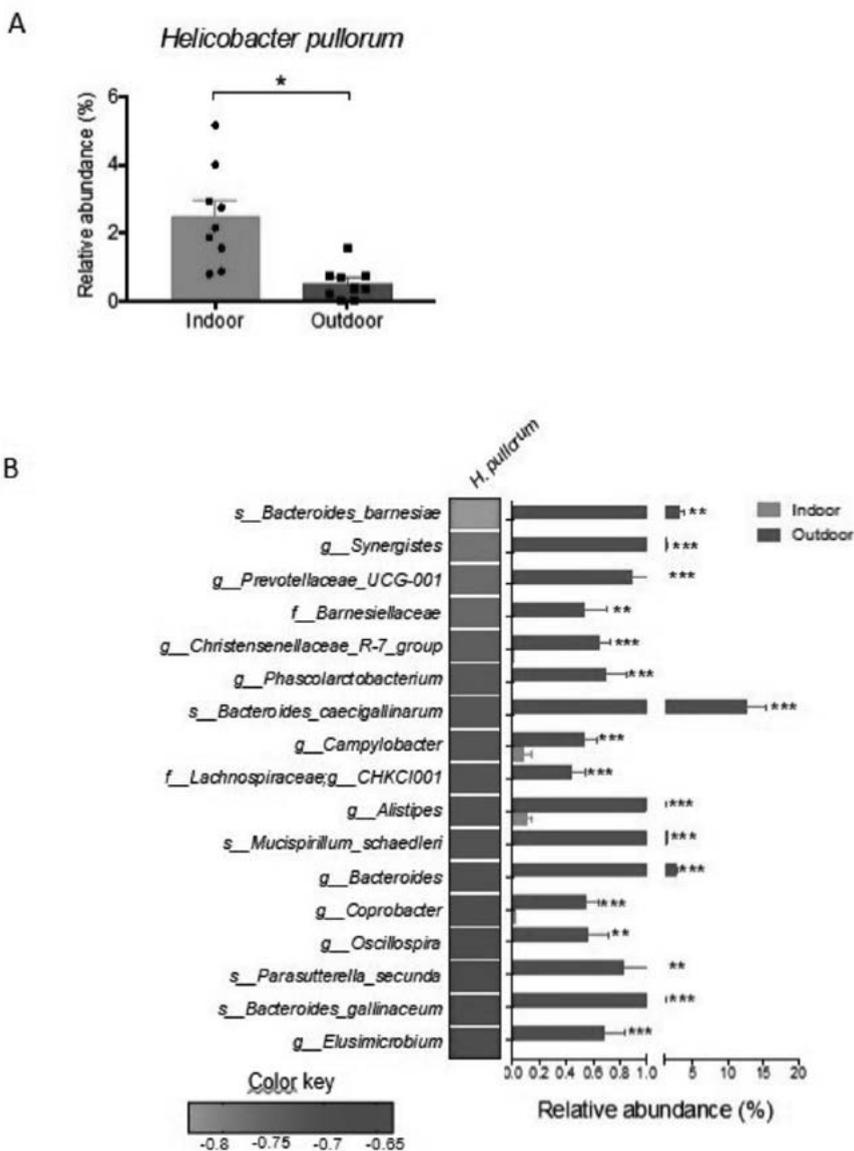


Figura 1 A) Abbondanza relativa di *H. pullorum* nei polli Indoor e Outdoor (2.46% e 0.52%, rispettivamente; $p < 0.05$) che mostra una riduzione del 78.8% con l'accesso all'aperto dei polli. **B)** Specie batteriche significative che correlano negativamente con *H. pullorum* (Coefficienti di correlazione di Spearman < -0.6). A sinistra: Heatmap evidenzia le specie batteriche con più alta (verde) e più bassa (rossa) correlazione con *H. pullorum*. A destra: media dell'abbondanza relativa delle specie batteriche significativamente differenti tra i polli Indoor e Outdoor sulla base del test t di Student corretto con il Benjamini-Hochberg *false discovery rate* (FDR); sono state elencate solo le specie con un'abbondanza relativa > 0.5 % in almeno un gruppo).

Un network di *co-occurrence and mutual exclusion* è stato creato per esplorare le interazioni microbiche tra le specie batteriche identificate e per individuare potenziali mediatori dello specifico assortimento microbico generato in risposta al passaggio dal sistema di allevamento Indoor a quello Outdoor. Il network è risultato costituito da 14 nodi (specie microbiche) collegati da 30 connessioni significative. *Bacteroides barnesiae* e un microorganismo non identificato del genere *Synergistes* erano le specie con il numero più elevato di connessioni e con l'indice di *closeness centrality* più alto, implicando la co-presenza di altre 7 specie batteriche e risultando, inoltre, negativamente correlate a *H. pullorum*. Infine, *H. pullorum* ha mostrato anche un'associazione negativa (indice di possibile esclusione mutualistica) con la specie *Bacteroides gallinaceum* e un'interazione di co-presenza con *Bacteroides vulgatus* (Fig. 2).

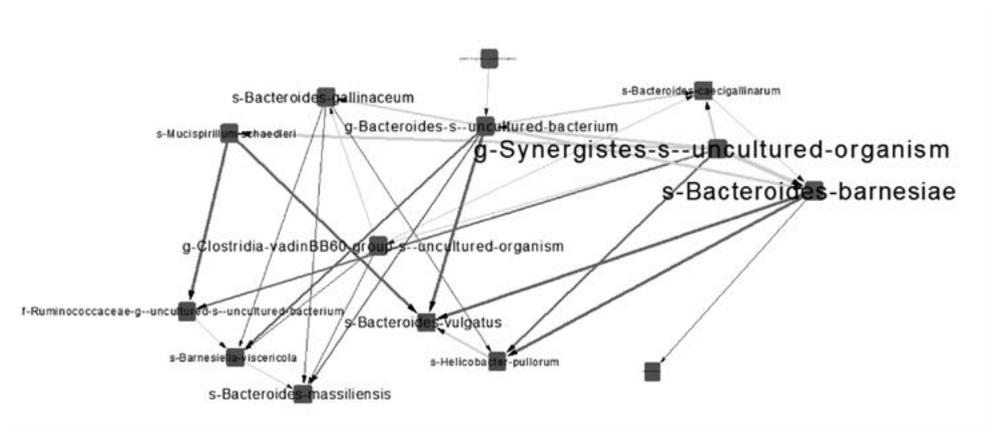


Figura 2. Network di *co-occurrence and mutual exclusion* delle specie discriminanti i gruppi Indoor e Outdoor. Nel network: i nodi rappresentano le specie e le linee (connessioni) mostrano le correlazioni non parametriche di Spearman con un coefficiente di correlazione > 0.6 (co-presenza) o < -0.6 (esclusione competitiva) statisticamente significativa ($p < 0.05$ con correzione Bonferroni); le connessioni verdi e rosse denotano rispettivamente un effetto positivo o negativo, dove la direzione delle frecce mostra la direzione dell'effetto; le dimensioni delle linee sono proporzionali all'indice di *closeness centrality*, parametro usato per misurare la centralità di un nodo nel network; i nodi blu e rossi rappresentano rispettivamente le specie batteriche risultate associate ai gruppi Indoor e Outdoor.

DISCUSSIONE

Helicobacter pullorum è un patogeno dal potenziale zoonotico in grado di colonizzare il tratto intestinale ed il fegato di specie aviari e dell'uomo provocando diverse patologie gastrointestinali ed epatiche. Negli avicoli, la prevalenza di questo microorganismo è sicuramente sottovalutata a causa delle sue particolari esigenze di crescita e della somiglianza fenotipica con alcune specie di *Campylobacter*, in particolare *C. coli* e *C. lari* (2). Data la scarsità e la natura frammentaria dei dati

disponibili in letteratura sulla presenza di *H. pullorum* nel pollame, il presente studio è stato concepito con l'intenzione di fornire una fotografia globale di un sistema di produzione semi-estensivo esaminando due momenti fondamentali del ciclo produttivo dei polli, relativamente alla presenza di questo patogeno zoonotico emergente.

È interessante notare come i nostri risultati abbiano mostrato una diminuzione significativa (78.8%) dell'abbondanza di *H. pullorum* nei polli con accesso all'aperto rispetto a quelli allevati al chiuso. Il primo time-point individuato è stato a 28 giorni di età, in quanto questo momento rappresenta il passaggio dall'allevamento al chiuso a quello all'aperto, quando il microbiota ha raggiunto un certo livello di maturità, pur considerando che lo sviluppo della comunità microbica sia una successione dinamica influenzata sia da processi correlati all'età che da fattori ambientali (cambiamenti nell'alimentazione, sviluppo del sistema immunitario ed esposizione a microrganismi estranei). Il secondo time-point (56 giorni di età) preso in esame rappresenta la fase finale di questo sistema produttivo e corrisponde al momento della macellazione, consentendo, pertanto, di valutare la composizione del microbiota cecale alla fine dell'intero periodo di accesso all'aperto. Sebbene *H. pullorum* sia stato associato a casi di enterite o epatite vibriónica negli avicoli, non tutti i ceppi sono responsabili di malattia clinica e si comportano come flora innocua del tratto intestinale, rendendo il pollame una specie serbatoio nella trasmissione zoonotica dell'infezione. Il meccanismo alla base di questo fenomeno non è del tutto noto, tuttavia potrebbe spiegarsi con la presenza di ceppi a differente virulenza. Infatti, contrariamente a quanto osservato per *Campylobacter*, non tutte le EHSs esprimono l'attività della CDT ed i relativi geni che svolgono probabilmente un ruolo eziologico nello sviluppo dei segni clinici e diarrea (2). Sulla base di tali considerazioni, il nostro studio ha documentato che alla fine del periodo produttivo, tutti gli animali si mostravano clinicamente sani e non si evidenziavano segni clinici di malattia, diarrea e mortalità. Alla necropsia non si evidenziavano segni di tiflite né lesioni macroscopiche nel tratto gastrointestinale. Sarebbe auspicabile una caratterizzazione genomica e molecolare per studiare la patogenicità di *H. pullorum* e i profili di virulenza più prevalenti, approfondendo, così, il suo potenziale zoonotico. Finora esso è stato associato approssimativamente al 12% di casi nell'uomo (1) in seguito alla contaminazione delle carcasse alla macellazione, in quanto tale agente patogeno è stato rilevato in un numero elevato di campioni cecali, dimostrando di essere in grado di persistere nei polli fino all'età della macellazione. Pertanto, dai risultati del presente studio si può ipotizzare che il potenziale zoonotico dell'infezione (attraverso la contaminazione delle carcasse) sia inferiore dopo un periodo di allevamento all'aperto.

Sulla base dei due time-point analizzati, gli stadi sopra descritti della vita produttiva dei broiler documentano pienamente l'evoluzione delle comunità microbiche come un processo continuo in cui nuovi taxa ne sostituiscono altri con l'accesso all'aperto dei polli e l'introduzione nella dieta di nuove fonti alimentari. Di conseguenza, si può supporre che la maggiore diversità microbica e l'espansione di altri taxa associati ad un intestino sano possano ridurre la probabilità di colonizzazione intestinale di *H. pullorum*. È di notevole interesse, infatti, la comparsa un mese dopo l'accesso all'aperto di nuovi phyla tra cui *Deferribacteres*, e, a livello di specie, l'insorgenza di *Mucispirillum schaedleri* (0% e 1.34% in Indoor e

Outdoor, rispettivamente). Quest'osservazione è in linea con altri studi che hanno descritto la comunità microbica intestinale di polli allevati con sistema free-range. *M. schaedleri* è noto per far parte della nicchia microbica associata al muco intestinale e, pertanto, può essere considerato un marker per la salute del tratto distale dell'intestino (11). Inoltre, altri studi riportano che questo batterio sia in grado di proteggere dalla colite indotta da *Salmonella* Typhimurium nel topo interferendo con l'espressione dei geni responsabili dell'invasione ed avendo, quindi, un potenziale per l'utilizzo terapeutico contro le infezioni da *Salmonella* nell'uomo (12). Il gruppo di polli allevati all'aperto ha evidenziato anche un aumento di *Oscillospira*, un genere batterico candidato tra i probiotici di nuova generazione con un elevato potenziale per l'utilizzo in campo medico. *Oscillospira* svolge un ruolo importante nel microbiota intestinale e la sua abbondanza è strettamente correlata alla salute dell'ospite. Nell'allevamento avicolo, l'utilizzo di probiotici e polifenoli influenza significativamente l'abbondanza di *Oscillospira* nell'intestino, migliorando l'incremento ponderale e la salute intestinale nei broiler. Inoltre, l'abbondanza di *Oscillospira* è correlata a una significativa riduzione della trasmissione orizzontale di ceppi patogeni di *E. coli* e della gravità dell'infezione nei pulcini prevenendo, inoltre, la patologia infettiva associata a *Clostridium difficile* (CDAD) nell'uomo, di cui il pollame rappresenta un possibile serbatoio (5, 13).

CONCLUSIONI

Il microbiota intestinale del pollo svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della salute dell'ospite ed il nostro studio suggerisce che il sistema di produzione e, in particolare, i sistemi di produzione alternativi, con accesso all'aperto, possono essere considerati fattori rilevanti nella costituzione di un microbiota intestinale sano. In particolare, sia *Mucispirillum schaedleri* che *Oscillospira* sono noti per esprimere proprietà microbiche benefiche con un interessante potenziale in qualità di markers batterici intestinali per la salute dell'ospite. Questi microrganismi potrebbero essere in grado di modulare la suscettibilità alle infezioni, come nel caso di *Helicobacter pullorum*, principalmente attraverso l'esclusione competitiva prevenendone, pertanto, la colonizzazione intestinale. Nel pollo, quindi, un microbiota intestinale sano può avere una forte influenza sia sulla salute dell'ospite che sulla produttività, oltre che sulla salute dei consumatori.

BIBLIOGRAFIA

1. Abd El-Ghany W. (2020). *Helicobacter pullorum*: A potential hurdle emerging pathogen for public health. *J. Infect. Dev. Ctries.* 14:1225-1230.
2. Ceelen LM, Decostere A, Chiers K, Ducatelle R, Maes D and F Haesebrouck. (2007). Pathogenesis of *Helicobacter pullorum* infections in broilers. *Int. J. Food Microbiol.* 116:207-13.
3. Manfreda G, Parisi A, Lucchi A, Zanoni RG and A De Cesare. (2011). Prevalence of *Helicobacter pullorum* in conventional, organic, and free-range broilers and typing of isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:479-84.
4. Javed S, Gul F, Javed K and H Bokhari. (2017). *Helicobacter pullorum*: An Emerging Zoonotic Pathogen. *Front Microbiol.* 10:8:604.
5. Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F and L Chiariotti. (2017). Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota

- composition and SCFAs production in laying hens. *Sci. Rep.* 16269.
6. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.
 7. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ and SP Holmes. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 13:581–3.
 8. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue): D590–6.
 9. Faust K and J Raes. (2016). CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape. *F1000Res.* 5:1519.
 10. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13:2498–504.
 11. Ocejo M, Oporto B and A Hurtado. (2019). 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. *Sci. Rep.* 9, 2506.
 12. Herp S, Durai Raj AC, Salvado Silva M, Woelfel S and B. Stecher. (2021). The human symbiont *Mucispirillum schaedleri*: causality in health and disease. *Med. Microbiol. Immunol.* 210:173-179.
 13. Yang J, Li H, Wen Z, Liu W, Meng L and H Huang. (2021). *Oscillospira* - a candidate for the next-generation probiotics. *Gut Microbes.* 13:1987783.

DIFFUSIONE DI SALMONELLE MULTI-RESISTENTI E DEI DETERMINANTI GENETICI DI ANTIMICROBICO RESISTENZA NELLA FILIERA ANTIBIOTIC-FREE DEL POLLO DA CARNE DEL CENTRO ITALIA

Di Francesco C.E.^{1*}, Ferri G.¹, Smoglica C.¹, Festino A.R.¹, Ruffini F.², Marsilio F.¹, Vergara A.¹

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

² Gesco Cons. Coop a r.l., 64020 Teramo, Italia.

* Presenting author

Summary

In this study a comparison of antibiotic resistance genes (ARGs) and multidrug resistant (MDR) *Salmonella* spp. strains between conventional and antibiotic-free broiler flocks were performed. At farm level, litter samples were screened by end-point PCR protocols, able to amplify ARGs against the most commonly used molecules in veterinary medicine along with selected Critically Important Antibiotics (CIA), reserved to human therapies. At slaughterhouse the carcasses obtained from both farming systems were sampled to identify resistant *Salmonella* spp. Based on the phenotypic resistance profiles of the strains, the related ARGs were investigated. A significant difference was observed for ARGs distribution between conventional and antibiotic-free litter samples, with particular regard for tetracyclines genes (*tet*) that were mostly detected in antibiotic-free flocks. *Salmonella* Typhi, Thiphymurium and Enteritidis serovars resulted equally distributed in carcasses of both investigated groups, all strains showing MDR profiles. These results are in line with previous investigations, raising concerns about the effective role of alternative meat production systems in reduction of MDR bacteria and their genetic determinants.

INTRODUZIONE

L'antimicrobico resistenza (AMR) rappresenta un problema emergente di sanità pubblica che coinvolge non solo la salute umana, ma anche quella degli animali e dell'ambiente (Hernando-Amado et al., 2019). Negli animali da reddito tale fenomeno è stato favorito dall'uso diffuso o eccessivo degli antibiotici, in passato impiegati anche per scopi preventivi e/o di metafilassi, e attualmente somministrati esclusivamente per il trattamento delle infezioni batteriche, che trovano nei sistemi intensivi di allevamento le condizioni favorevoli per diffondersi (de Mesquita Souza Saraiva, 2022). La pressione selettiva esercitata dalle terapie antibiotiche ha permesso la diffusione e il mantenimento nell'ambiente di batteri resistenti a più classi di molecole antimicrobiche (batteri multi-resistenti), capaci di trasferire ad altre cellule batteriche i relativi geni di antimicrobico resistenza, molti dei quali localizzati su elementi genetici mobili (Yang et al., 2019).

Al fine di ridurre la diffusione di batteri resistenti e la loro trasmissione ai consumatori attraverso il consumo di prodotti contaminati di origine animale, il settore zootecnico ha sviluppato sistemi alternativi di allevamento "senza uso di molecole antibiotiche" in grado di soddisfare la crescente domanda da parte dei consumatori, sempre più attenti all'acquisto di prodotti più sostenibili, sani e rispettosi del benes-

sere animale. In particolare, la filiera avicola ha visto crescere notevolmente le linee “antibiotic-free” e biologiche che hanno registrato un incremento del 20% negli anni 2020/2021 rispetto al biennio precedente (ISMEA, 2021). Gli effetti che gli allevamenti antibiotic-free possono avere sulla diffusione dell’AMR non sono ancora del tutto conosciuti e i dati relativi alla reale diffusione di batteri resistenti e multi-resistenti e dei relativi determinanti genetici in questi sistemi alternativi non vengono ancora raccolti e monitorati in maniera sistematica e standardizzata, ma risultano ancora frammentari e disomogenei (Millmann et al., 2013; Bailey et al., 2020; Musa et al., 2021; Salerno et al., 2022).

Scopo del presente lavoro è stato di comparare la diffusione negli allevamenti di broiler convenzionali e antibiotic-free dei geni responsabili di AMR e di determinare i profili di resistenza antibiotica in ceppi di *Salmonella enterica* isolati a partire dalle carcasse a fine macellazione provenienti dalla stessa filiera produttiva.

MATERIALI E METODI

Sulla base dei risultati ottenuti in una precedente indagine, che ha coinvolto allevamenti convenzionali di broiler e tacchini del Centro Italia (Di Francesco et al., 2021), sono stati selezionati n. 3 allevamenti convenzionali (C1-C3) e n. 3 allevamenti antibiotic-free (AF1-AF3) di broiler ubicati in Abruzzo e appartenenti alla stessa filiera produttiva integrata. L’analisi degli allevamenti ha riguardato campioni di lettiera raccolti a pochi giorni dall’accasamento dei pulcini (7-10 gg) e a fine ciclo, prima della macellazione dei capi (35-40 gg di età degli animali).

Al fine di ottenere una valutazione rappresentativa della reale diffusione ambientale dei geni di AMR, indipendentemente dalle specie batteriche presenti, è stato eseguito uno screening biomolecolare, mediante protocolli di PCR, per l’amplificazione diretta di geni target specifici per la resistenza batterica nei confronti di antibiotici comunemente impiegati nella pratica clinica veterinaria (tetracicline, lincomicina, aminoglicosidi, chinoloni; nitrofurani; sulfonamidici e beta-lattamici), insieme ad alcune molecole classificate come criticamente importanti per la medicina umana (CIA) e, pertanto, ad uso esclusivo per le terapie delle infezioni umane (cloramfenicolo, vancomicina e carbapenemi) (EMA, 2022) (**Tabella 1**). A tal fine, il DNA totale è stato ottenuto da ciascun campione di lettiera mediante il protocollo automatizzato previsto dal Maxwell® 11 Instrument e utilizzando il Maxwell kit® 11 Tissue DNA Purification (Promega, Italy).

Le carcasse di broiler, provenienti dalla stessa filiera produttiva degli allevamenti oggetto di indagine, sono state sottoposte a campionamento al termine della linea di macellazione, mediante spugne sterili (Polywipes® RPM Technology, LLC, USA), utilizzate su tutta la superficie cutanea di ciascuna carcassa, e successivamente immerse in acqua peptonata sterile (BPW; LIOFILCHEM® s.r.l., Italia). Le spugne sono state raggruppate in 36 pool, ciascuno costituito da 5 spugne, per un totale di n. 18 campioni provenienti dalle carcasse di broiler degli allevamenti convenzionali e n. 18 campioni provenienti dalle carcasse di broiler degli allevamenti antibiotic-free. I campioni di spugne così raccolti sono stati utilizzati per l’isolamento di *Salmonella* spp. seguendo la relativa procedura (UNI EN ISO6579-1:2020), al fine di valutare il rischio di trasmissione all’uomo attraverso il consumo delle carni avicole.

Per ciascun ceppo batterico isolato, la specie di appartenenza e il relativo profilo di AMR sono stati determinati mediante il sistema automatizzato VITEK® 2

(bioMérieux, France), mentre la caratterizzazione della sierovariante è stata ottenuta mediante PCR (Park et al., 2009). I valori della minima concentrazione inibente (MIC) per ciascuna molecola sono stati interpretati utilizzando come riferimento i breakpoints della European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021).

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di sensibilità agli antibiotici, è stato effettuato lo screening molecolare dei geni responsabili della resistenza, a partire dal DNA batterico estratto mediante bollitura, e impiegando gli stessi primers utilizzati per l'analisi delle lettieri degli allevamenti.

Infine, è stata effettuata l'analisi statistica, mediante il software STATA (2019), per valutare eventuali differenze nella distribuzione dei geni di resistenza tra le due tipologie di allevamento, applicando il T-test ($p < 0.05$) e per comparare i profili di resistenza fenotipica dei ceppi batterici isolati dalle carcasse dei due gruppi, applicando il test chi-quadro (χ^2) ($p < 0.05$).

Tabella 1. Elenco dei geni di resistenza amplificati mediante PCR a partire dai campioni di lettiera e carcasse

Antibiotico	Geni di resistenza	Bibliografia primers*
Aminoglicosidi	<i>aadA2</i> ; <i>aac(3)IV</i> ; <i>aadB</i>	Prasertsee et al., 2016; Kozak et al., 2009
Ampicillin	<i>bla_{TEM}</i> ; <i>bla_{PSE}</i>	Kikuvu et al., 2010
Carbapenemi	IMP; OXA-48; NDM; KPC	Hatrongjit et al. 2018
Chinoloni	<i>parC</i>	El-Tayeb et al., 2017
Cloramfenicolo	<i>catA1</i>	Kikuvu et al., 2010
Lincomycin	<i>lnuA</i> ; <i>lnuB</i>	Lina et al., 1999; Bozdogan et al., 1999
Linezolid	<i>cfr</i> ; <i>optrA</i> ; <i>poxtA</i>	Bender et al. 2019
Nitrofurantoina	<i>nfsA</i> ; <i>nfsB</i>	Garcia et al., 2017
Quinupristin/ Dalfopristin	<i>vatD</i> ; <i>vgaA</i> ; <i>vgaB</i> ; <i>vgbB</i> ; <i>msrC</i> ; <i>vgbA</i> ; <i>ermB</i> ; <i>vatE</i>	Shaw et al., 2018
Tetraciclina	<i>tetA</i> ; <i>tetB</i> ; <i>tetC</i> ; <i>tetL</i> ; <i>tetM</i> ; <i>tetK</i> ; <i>tetA(P)</i> ; <i>tetB(P)</i>	Kikuvu et al., 2010; Trzcinski et al. 2000; Aminov et al. 2001; Gevers et al. 2003; Lyras and Rood, 1996; Aminov et al., 2001
Trimethoprim/ Sulfamethoxazolo	<i>sul1</i> ; <i>sul2</i> ; <i>sul3</i>	Costa et al., 2008
Vancomicina	<i>vanA</i> ; <i>vanB</i> ; <i>vanC1</i> ; <i>vanC2</i> ; <i>vanD</i> ; <i>vanM</i> ; <i>vanN</i>	Nomura et al., 2018

*Aminov et al. (2001). *J. Appl. Environ. Microbiol.* 67, 22-32. Bender et al. (2019). *J. Microbiol. Methods.* 160, 101-103. Bozdogan et al. (1999). *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925-929. Costa et al. (2008). *Microbial. Drug Resist.* 14, 71-77. El-Tayeb et al. (2017). *Braz. J Microbiol.* 48, 499-508. Garcia et al. (2017). *Microbial Drug Resist.* 23, 405-412. Gevers et al (2003). *J. Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1270-1275. Hatrongjit et al. (2018). *MethodsX.* 5, 532-536. Kikuvu et al. (2010). *J. Infect. Develop. Count.* 4, 243-248. Kozak et al. (2009). *J. Appl. Environ. Microbiol.*

75, 559-566. Lina et al., (1999). *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1062–1066. Lyras et al (1996). *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2500-2504. Nomura et al. (2018). *J. Microbiol. Methods.* 145, 69-72. Prasertsee, et al. (2016). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6, 390-395. Shaw et al (2018). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 959-967. Trzcinski et al. (2000). *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 763-770.

RISULTATI

Negli allevamenti convenzionali i geni di resistenza *catA1* (per il cloramfenicolo), *aadA2* (per gli aminoglicosidi), *sul2* (per i sulfamidici) e *blaTEM* (per l'ampicillina) sono stati amplificati in tutti i campioni, seguiti dai geni *tet* (tetracicline), fatta eccezione per *tetB(P)* e *tetC*. Nessuna positività è stata osservata per le PCR specifiche per i geni di resistenza per vancomicina, carbapenemi, chinoloni, nitrofurantoina, linezolid e quinopristina/dalfopristina.

Nella linea antibiotic-free i geni *aadA2*, *sul1*, *sul2*, *blaTEM*, e *msrC* (specifico per la resistenza ai macrolidi) sono stati amplificati in tutti gli allevamenti, mentre tutti i geni *tet* sono risultati presenti in almeno un allevamento. Il gene *vatE* (specifico per quinopristina/dalfopristina) è stato amplificato in un allevamento antibiotic-free (**Grafico 1**). Una differenza significativa è stata osservata nella distribuzione di geni di resistenza tra le due tipologie di lettiera (p=0.02).

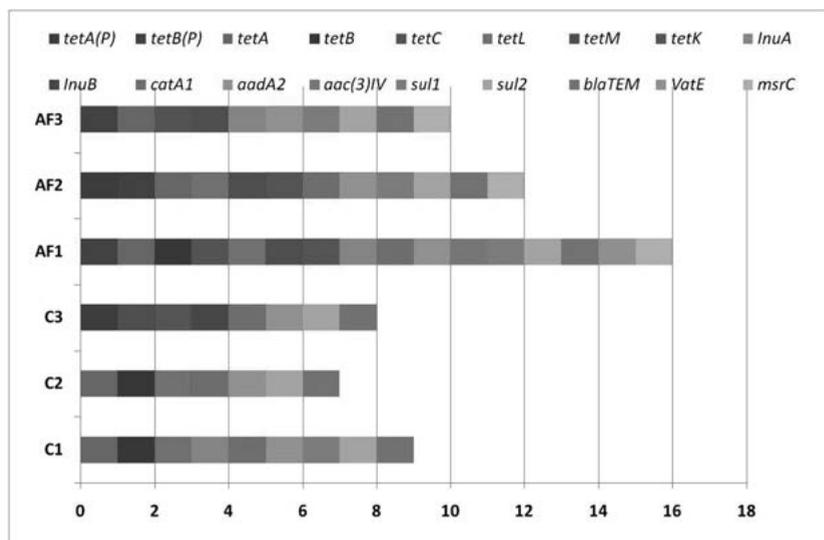


Grafico 1. Distribuzione de geni di resistenza amplificati a partire dai campioni di lettiera prelevati negli allevamenti convenzionali (C1-C3) e antibiotic-free (AF1-AF3)

Le indagini microbiologiche delle carcasse hanno permesso di isolare n. 14 ceppi di *Salmonella enterica* ugualmente distribuiti tra le due linee di macellazione, appartenenti al sierovarianti Typhi, Thiphymurium ed Enteritidis.

Le prove di sensibilità agli antibiotici hanno evidenziato profili di resistenza multipla in tutti i ceppi di *Salmonella* (**Tabella 2**), non evidenziando alcuna differenza significativa tra le due tipologie di allevamento di origine degli isolati (p>0.05).

I geni di resistenza amplificati a partire dal DNA batterico sono risultati essere correlati alle resistenze per tetracicline, aminoglicosidi, nitrofurani, sulfamidici, beta-lattamici, chinoloni, linezolid, quinopristina/dalfopristina, lincomicina e carbapenemi (**Tabella 2**).

Tabella 2. Profili fenotipici e genetici dei ceppi di *Salmonella* isolati dalle carcasse di broiler

ID	Ceppo	Allevamento	Resistenza fenotipica	Geni di resistenza
1	<i>Salmonella</i> Typhi*	AF1	AK; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; OXA-48</i>
2	<i>Salmonella</i> Typhi*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; OXA-48</i>
3	<i>Salmonella</i> Typhi*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TSZ; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; sul1; sul2</i>
4	<i>Salmonella</i> Typhi*	C1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL</i>
5	<i>Salmonella</i> Typhi*	C1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; bla_{TEM}; tetA; tetB; tetC; oprA</i>
6	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL</i>
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetL</i>
8	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	C1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; OXA-48</i>
9	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	C1	AK; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; OXA-48</i>
10	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	C2	AK; CXT; GEN; NIT; TET	<i>parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC</i>
11	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	C1	NIT; QPD; STP; TET; VAN	<i>parC; 1tetM; tetL; InuB</i>
12	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	C2	AK; GEN; NIT; TET	<i>parC; tetB; tetC</i>
13	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	AF2	AK; GEN; NIT; TSZ; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetL; sul1; sul2</i>
14	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	AF2	AK; AML; AMP; CXT; GEN; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetL</i>

AML: amoxicillina; AMP: ampicillina; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxime; CZD: ceftazidime; ERP: ertapenem; MRM: meropenem; NIT: nitrofurantoina; PTZ: piperacillina-tazobactam; TET: tetracicline; TSZ: trimethoprim-sulfamethoxazolo.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano il ruolo delle lettiere e delle deiezioni animali nella diffusione ambientale dei determinanti di AMR, che, attraverso varie fonti (prodotti di origine animale, reflui, vegetali, altre specie animali) possono raggiungere l'uomo

e comprometterne la salute, rendendo più difficoltosa la scelta di opzioni terapeutiche efficaci in medicina umana (EFSA, 2021).

Nonostante la linea antibiotic-free non preveda l'impiego di molecole antimicrobiche, la filiera avicola investigata in questo studio ha dimostrato un'ampia diffusione di geni di resistenza, sollevando dubbi sull'effettivo ruolo delle produzioni alternative nella riduzione dell'AMR. È probabile che il ridotto numero di allevamenti campionati possa aver influito su tale risultato, anche se i dati disponibili in bibliografia non sono del tutto univoci nel considerare il ruolo protettivo degli allevamenti senza uso di antibiotici nei confronti della selezione dei fattori di AMR. In particolare, un'ampia diffusione del gene *tetM* è stata recentemente riportata in campioni fecali di galline ovaiole e broiler di allevamenti antibiotic-free in Australia (Liu et al., 2020), così come il gene *tetA* è risultato particolarmente abbondante in un allevamento della stessa tipologia, ubicato in Nord-Italia (Salerno et al., 2022).

In effetti, le tetracicline rappresentano ancora una delle classi di antibiotici maggiormente prescritte per gli animali da reddito in Italia, nonostante sia stato possibile osservare nello stesso periodo una forte contrazione del loro utilizzo soprattutto rispetto ad altri Paesi UE (EMA, 2021). A conferma di ciò, la filiera avicola investigata in questo studio ha considerevolmente ridotto l'impiego delle tetracicline per i trattamenti terapeutici degli animali, escludendo questa tipologia di molecole anche negli allevamenti convenzionali (Dr. Ruffini, comunicazione personale).

Tuttavia, non è possibile escludere che i geni di resistenza riscontrati negli allevamenti antibiotic-free siano la conseguenza dei trattamenti antibiotici eseguiti in passato, in grado di esercitare una pressione selettiva a lungo termine nell'ambiente (Khine et al., 2022), o che siano presenti altre fonti di contaminazione ambientale (acqua, alimenti o volatili selvatici) che non sono state oggetto di indagine (EFSA, 2021; Storey et al., 2022).

Sulla base di queste informazioni sarebbe utile predisporre Piani di Sorveglianza dell'AMR che includano diverse tipologie di campioni biologici e/o ambientali nelle filiere alimentari di origine animale e che possano monitorare nel tempo un'eventuale riduzione della disseminazione dei pattern di resistenza nelle produzioni alternative.

Le indagini microbiologiche eseguite sulle carcasse provenienti dalle stesse tipologie di allevamento hanno ulteriormente evidenziato un quadro contraddittorio nei confronti della linea antibiotic-free, poiché i profili di AMR non sembrano essere influenzati dalla tipologia produttiva. Infatti, tutti i ceppi di *Salmonella*, indipendentemente dalla loro origine, hanno mostrato profili di resistenza multipla (beta-lattamici, nitrofurani, sulfamidici e tetracicline), risultando positivi anche ai rispettivi geni di resistenza *tet*, *sul*, e *nfs*, suggerendo un rischio di trasmissione al consumatore di questi patogeni.

I dati disponibili in letteratura riportano una diversa distribuzione di *E. coli* antibiotico-resistenti negli allevamenti avicoli antibiotic-free in relazione alla molecola considerata, ad esempio più alta per tigecciclina, azitromicina e gentamicina, e sensibilmente più bassa per quanto riguarda cefotaxime, ceftazidime e ciprofloxacina, mentre i ceppi multi-resistenti appaiono ugualmente distribuiti (Musa et al., 2021). Al contrario, il sistema di allevamento non sembra influire sulla probabilità di isolare ceppi resistenti di *Salmonella*, *E. coli* e *Campylobacter* spp. da carne avicola (Milman et al., 2013; Dixie et al., 2014).

Anche in questo caso sarebbe auspicabile svolgere ulteriori indagini per escludere eventuali altre fonti di contaminazione diversi dagli allevamenti di origine, probabilmente collegate alle possibili cross-contaminazioni che si possono verificare lungo la catena di macellazione.

CONCLUSIONI

In questo studio è stato applicato un approccio multidisciplinare, basato su metodi di coltura-indipendenti e tecniche microbiologiche più tradizionali, e coinvolgendo l'intera filiera produttiva del pollo da carne, partendo dagli allevamenti fino alla macellazione degli animali, al fine di ottenere un'ampia valutazione del livello di diffusione dei determinanti di AMR nel settore avicolo. I profili di resistenza riscontrati sono quelli relativi alle molecole più comunemente impiegate nella pratica clinica veterinaria, ma sono state evidenziate anche resistenze nei confronti di antibiotici criticamente importanti per la salute umana. La filiera antibiotic-free non sembra influire sulla distribuzione di *Salmonelle* multi-resistenti, sottolineando l'esigenza di approfondire le indagini nei confronti dei sistemi alternativi di allevamento, sempre più richiesti dal consumatore perché percepiti come efficaci nel produrre alimenti più sostenibili e sani.

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey M, Taylor R, Brar J, Corkran S, Velásquez C, and Novoa-Rama E, (2020). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* from Antibiotic-Free Broilers During Organic and Conventional Processing. *J. Food Prot.* 83, 491-496.
2. de Mesquita Souza Saraiva, M.; Lim, K.; do Monte, D.F.M.; Givisiez, P.E.N.; Alves, L.B.R.; de Freitas Neto, O.C.; Kariuki S; Júnior AB, de Oliveira CJB, and Gebreyes WA. (2022). Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. *Braz J Microbiol.* 53(1):465-486.
3. Di Francesco CE, Smoglica C, Profeta F, Farooq M, Di Giannatale E, Toscani T, and Marsilio F. (2021) Research Note: Detection of antibiotic-resistance genes in commercial poultry and turkey flocks from Italy. *Poult Sci.*, 100(5):101084.
4. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA J.* 19, e06651.
5. EUCAST (2021). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/\(accessed%20on%2030th%20September%202021\)./](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/(accessed%20on%2030th%20September%202021)./)
6. European Medicines Agency. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, (2021). 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020'. (EMA/58183/2021).
7. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, and Martínez JL. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiol.* 4, 1432–1442.
8. ISMEA, Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare. Il Biologico nel 2021 e il futuro del settore. Available online at file:///C:/Users/cedifrancesco/

- Downloads/Agricoltura biologica Overview 2022 040722.pdf.
9. Khine NO, Lugsomya K̄, Niyomtham W, Pongpan T̄, Hampson DJ, and Prapasaraku, N. (2022). Longitudinal Monitoring Reveals Persistence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* on a Pig Farm Following Cessation of Colistin Use. *Front Vet Sci.* 9:845746.
 10. Liu Y, Dyall-Smith M, Marenda M, Hu HW, Browning G, and Billman-Jacobe H. (2020). Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic-Free Chicken Farms. *Antibiotics (Basel).*, 9(3):120.
 11. Millman JM, Waits K, Grande H, Marks AR, Marks JC, and Price LB. (2013). Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in retail chicken: comparing conventional, organic, kosher, and raised without antibiotics. *F1000Res.* 2, 155.
 12. Mollenkopf DF, Cenera JK, Bryant EM, King CA, Kashoma I, Kumar A, Funk JA, Rajashekar G, and Wittum TE. (2014). 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.* (12):920-9.
 13. Musa L, Proietti PC, Marenzoni ML, Stefanetti V, Kika TS, Blasi F, (2021). Susceptibility of Commensal *E. coli* Isolated from Conventional, Antibiotic-Free, and Organic Meat Chickens on Farms and at Slaughter toward Antimicrobials with Public Health Relevance. *Antibiotics.* 10, 1321.
 14. Salerno B, Furlan M, Sabatino R, Di Cesare A, Leati M, Volanti M, Barco L, Orsini M, Losasso C, and Cibir V. (2022). Antibiotic resistance genes load in an antibiotic-free organic broiler farm. *Poult Sci.*, 101(3):101675.
 15. Storey N, Cawthraw S, Turner O, Rambaldi M, Lemma F, Horton R, Randall L, Duggett NA, Abu Oun M, Martelli F, and Anjum MF. (2022). Use of genomics to explore AMR persistence in an outdoor pig farm with low antimicrobial usage. *Microbial genomics.* 8(3):000782.
 16. Yang Y, Ashworth AJ, Willett C, Cook K, Upadhyay A, Owens PR, Ricke SC, DeBruyn JM and Moore PA Jr. (2019). Review of Antibiotic Resistance, Ecology, Dissemination, and Mitigation in U.S. Broiler Poultry Systems. *Front. Microbiol.* 10:2639.

MOLECULAR GENETIC SELECTION TO REDUCE SALMONELLA TYPHIMURIUM CIRCULATIONS IN CHICKENS

Saleh M.^{1,2}, Pugliese N.¹, Schiavone A.¹, Samarelli R.¹, Circella E.¹, Siddique I.¹, Camarda A.¹

¹*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S.P. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (Bati), Italia*

²*Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt*

Summary

Salmonella infection in chickens continues to be a major public health concern. Among *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium is the cause of severe intestinal pathology in young chicks and economic losses for the poultry industry. Additionally, *S. Typhimurium* could infect humans and result in an acute gastrointestinal infection. Controlling *S. enterica* in poultry industry is an ongoing concern for several countries around the world. Increasing the genetic resistance of chicken to salmonella by genetic selection programs, which may be carried out using phenotypic or genotypic data, is an efficient way to prevent salmonellosis. The first generations of simple crossing between Fayoumi (F) and Rhode Island Red (R) breeds and their $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ and reciprocal $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ crosses were utilized to estimate heterotic effects. Also, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect polymorphic associations of gallinacin (*Gal*) genes (*Gal2*, *Gal3*, *Gal4* and *Gal5*) with caecal bacterial count of *S. Typhimurium*, and IgA, IgG and IgM antibody titres in the studied populations. The chicks of each genetic group (120 birds) were infected with *S. Typhimurium* at 10 day of age (10^6 cfu/chick). The R breed had a significantly higher least square mean of *S. Typhimurium* load, followed by $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ cross, $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ cross, and F breed while, The F breed had the highest LSMs of IgA, IgG, and IgM antibody titres, followed by $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ cross, $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ cross, and the R breed. Direct heterosis estimates were significant for *S. Typhimurium* count and IgA antibody titre, but not for IgG and IgM antibody titres. For molecular associations, the CC genotype of *Gal3* gene had a significant lower *S. Typhimurium* count and higher IgA and IgM antibody titres than TT genotype in R breed, while the birds of the genotype TC had lower significant *S. Typhimurium* count in $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ crossbred and significant higher antibody titres in $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ crossbred. In the *Gal4* gene, birds with the GG genotype had a lower significant *S. Typhimurium* count and IgA, IgG and IgM antibody titres than birds with the AA genotype in R breed, but birds of the genotype AG had higher significant IgA, IgG and IgM antibody titers in $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ crossbred than the birds of GG and AA genotypes. Birds with the CC genotype of *Gal5* gene had lower significant *S. Typhimurium* count and higher IgA and IgG antibody titers. The birds with genotype AA had lower significant *S. Typhimurium* count and higher significant IgA and IgG antibody titers than birds with CA genotype. This study suggested that the Fayoumi breed may be employed in breeding programs to boost immunity against *S. Typhimurium* in chickens, and the *Gal3*, *Gal4*, and *Gal5* genes might be used as marker-assisted selection in chicken selection programs to increase *S. Typhimurium* resistance.

INTRODUCTION

Salmonella enterica is among the most common bacteria infecting chickens. It is a Gram-negative, facultative anaerobe microbe that is flagellated and rod-shaped. *S. enterica* infection in chickens can occur at any age, but hatched chicks are more sensitive to the infection (Gast, 1997). *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, and *Salmonella subterranea* are the three species included within the genus *Salmonella*. Human salmonellosis is mostly due to the consumption of contaminated chicken meat and eggs. As a result, the occurrence of salmonella infections in chicken flocks and their management are still major public health concerns (Yang et al., 2019). *S. enterica* (*S.*) serovars Enteritidis and Typhimurium can survive in the chickens' gastrointestinal tract (GIT), particularly in the caecum. In birds, *S. enterica* produces both systemic and asymptomatic infections (Li et al., 2018).

Vaccination is a frequently used method of disease prevention. Producers that have a little number of poultry rarely vaccinate them. These circumstances put small-scale chicken farms at risk of infection, which could lead to the contamination of meat and eggs. This problem could be overcome by selecting chicks that are resistant to the infectious pathogens. Enhancing chicken health is a fundamental objective of poultry breeding, and crossbreeding is one of the strategies for leveraging genetic variety. Genetic polymorphism is becoming more relevant as a source of genetic markers in several sectors of chicken breeding. Characterization of molecular markers, as well as functional genomic approaches, could be used to improve immune responses against *Salmonella* in chickens. Researches on resistance to *Salmonella* spp. in poultry have showed that the genetic effects are significant (Kramer et al., 2003; Iraqi et al., 2011; Zhang et al., 2020). Molecular technologies are being used as a new frontier for identifying molecular markers to be employed in marker-assisted selection procedures in order to achieve larger genetic gains in crossbreeding programs (Wakchaure et al., 2015).

Gallinacin genes 1 to 13 were localized on chromosome 3 in chickens, and each gallinacin gene has the same genomic structure of four short exons separated by three different length introns (Xiao et al., 2004). Gallinacin transcription has been found to be abundant in cells involved in the innate immune system response to microbial pathogens (Ganz, 2003; Xiao et al., 2004), and they have antibacterial efficacy against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Higgs et al., 2005). The proposed activity mechanism consists of the initial binding to the bacterial membrane through electrostatic interactions, followed by the penetration within the cytoplasmic environment and, finally, the interaction with the machineries devoted to the RNA, DNA and protein synthesis, blocking them (Hasenstein and Lamont, 2007; Zhang et al., 2020).

The haplotypes of the immune-related genes have shown strong correlations with the immune response against salmonella in chickens (Hasenstein et al., 2006; Legarra et al., 2011; Ardiyana et al., 2020). However, there have been few studies about the relationship between gallinacin genes and immunological characteristics in chickens. In an effort to go deeper into some of these ideas, the main objectives of the current study to estimate direct heterosis on caecal *S. Typhimurium* bacterial count and antibody titers of IgA, IgG, and IgM in crossing

between Fayoumi and Rhode Island Red chickens, to determine associations of *Gal2*, *Gal3*, *Gal4* and *Gal5* genes with *S. Typhimurium* bacterial count, and IgA, IgG, and IgM antibody titers.

MATERIAL AND METHODS

Crossbreeding

A crossbreeding experiment was conducted between Fayoumi (F) and Rhode Island Red (R) to obtain $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ cross and its reciprocal $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ cross. Chicks of F, R, $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ and $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ populations (120 birds from each genetic group) were inoculated with *S. Typhimurium* at 10 days of age (10^6 colony-forming units (cfu) in 1 ml per chick).

Examination of the bacterial count in the caecum and antibody titres

At the 10th week of age, 24 birds from each group's caecum were sampled for bacteria using *S. Typhimurium* culture and quantification methods (Saleh et al. 2021). In order to detect the antibody titres, blood samples were collected in the 4th week of age from 12 chicks from each population. Antibody titres were detected using the Calbiotech Inc. (CBI) Salmonella spp. IgA, IgG, and IgM ELISA Kits (Cat#: ST093G 96 Tests).

Blood sampling, DNA extraction and PCR-RFLP

For the PCR-RFLP assays, 96 blood samples from the four genetic groups of chickens were obtained (24 samples from each population of F, R, $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ and $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ chicks). The primers, DNA extraction process, polymorphic assessment of genetic immune response of *Gal2*, *Gal3*, *Gal4* and *Gal5* genes, and PCR-RFLP test for genotyping SNPs of Gal genes on chromosome 3 utilizing *Hpy-CH4IV*, *AvaI*, *AluI*, and *HinfI* restriction enzymes, along with the procedures, have been previously described (Saleh et al., 2021).

Statistical models for estimating heterotic effects and polymorphic associations

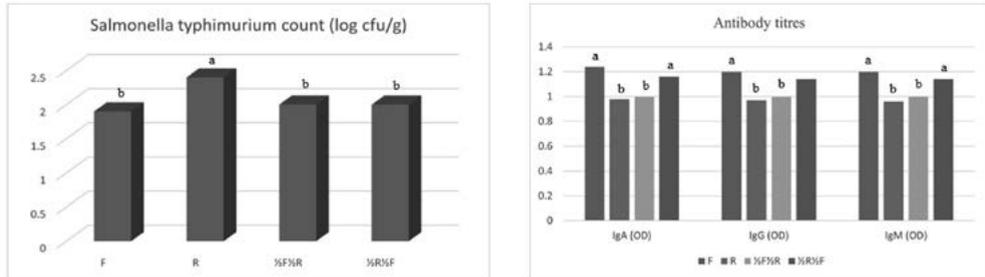
Data of *S. Typhimurium* bacterial count and IgA, IgG, and IgM antibody titers were analyzed using the animal model and the estimation of heterotic effects as described by Saleh et al. (2022). Also, the animal model used to detect the polymorphic associations among genotypes of *Gal* genes and immunity traits was described by Saleh et al. (2021).

RESULTS

Populations means

The generalized least square means (GLMs) for *S. Typhimurium* count bacterial count and antibody titers were presented in Figure 1. The results showed that the bacterial counts of *S. Typhimurium* in R breed were highly significant, followed by $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ cross, $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ cross and F breed, while the means of IgA, IgG, and IgM antibody titers in F breed were highly significant, followed in descending order by $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ cross, $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ cross, and R breed.

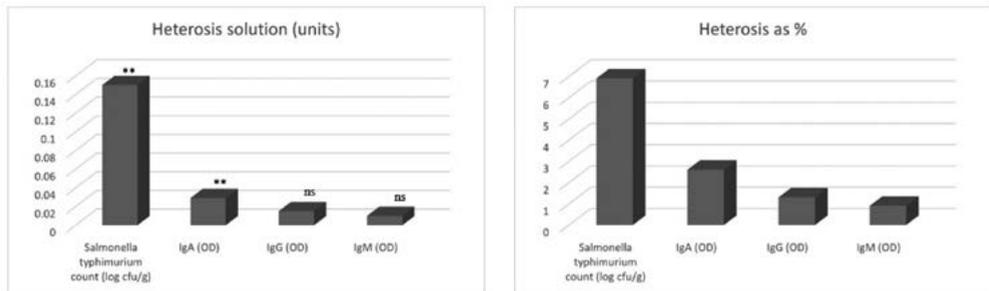
Figure 1. Generalized least-square means for *Salmonella* Typhimurium count and antibody titers as affected by genetic group of chicks. R= Rhode Island Red breed; $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ = Rhode Island Red \times Fayoumi; $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ = Fayoumi \times Rhode Island Red; Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$; cfu= colony forming units; OD= optical density.



Heterosis effects

The heterotic effects were significant for *S. Typhimurium* count, and for IgA antibody titer, but non-significant for IgG and IgM antibody titers (Figure 2). In addition, the heterotic percentages for *S. Typhimurium* count and IgA antibody titer were significant ($p < 0.01$).

Figure 2. The generalized least square solutions of heterotic effects for microbiological and immunological traits in crossing Fayoumi with Rhode Island Red chickens. Percentages of heterosis computed as $\{\text{Estimate of in heterosis units}/[(F+R)/2] \times 100\}$; ns = non-significant; ** = significant differences at $p < 0.01$; cfu= colony forming units; OD= optical density.



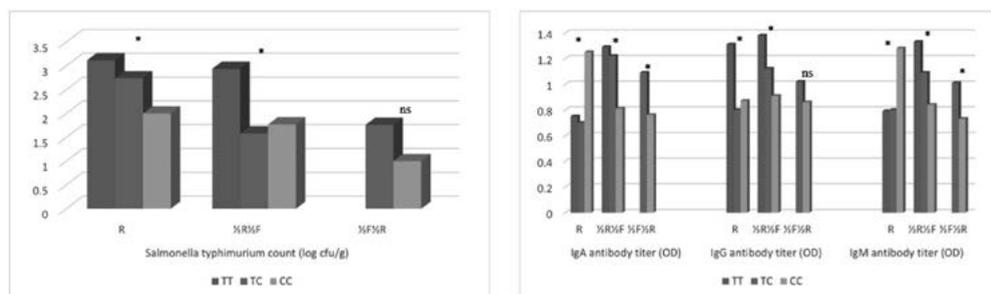
PCR amplification and digestion

PCR products of 583, 664, 600 and 623 bp in size for *Gal2*, *Gal3*, *Gal4* and *Gal5* genes respectively, were amplified in the four studied populations. The PCR-RFLP digestion of PCR products in parents and F_1 progeny using the *HpyCh4IV* restriction enzyme for *Gal2* gene were monomorphic and included two fragments of 388 and 195 bp (CC genotype). For the *Gal3* gene, the PCR-RFLP digestion with *AvaI* produced fragments including a single uncut fragment of 664 bp (TT genotype; the common homozygote), two fragments of 443 and 221 bp (CC gen-

otype; the minor homozygote) and three fragments of 664, 443 and 221 bp (TC genotype; the heterozygote). For the *Gal4* gene, the *AluI* restriction enzyme produced fragment sizes of 600, 416 and 184 bp, the major homozygote was AA and the AG genotype was the heterozygote, while the GG genotype was the minor homozygote. For the *Gal5* gene, the PCR-RFLP products of 623, 402 and 133 bp digested by the *HinfI* restriction enzyme represented the major CC homozygote, the CA heterozygote and minor AA homozygote.

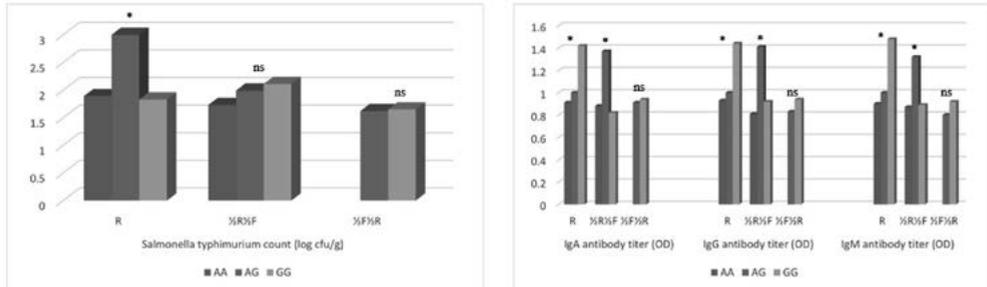
Polymorphic associations between the genotypes of Gal genes and studied traits
 The *Gal2* gene in all populations was monomorphic and *Gal3*, *Gal4* and *Gal5* genes were monomorphic in the F breed, so they were excluded from the association analysis. The genotypes of *Gal3* gene were associated significantly with *S. Typhimurium* count, along with IgA, IgG and IgM antibody titres (Figure 3). The genotype CC of *Gal3* gene breed had lower significant *S. Typhimurium* count and higher IgA and IgM antibody titers than TT genotype in R and ½R½F chickens. The TC genotype in ½R½F crossbred had a lower significant *S. Typhimurium* count than TT genotype and there were non-significant differences between the TC and CC genotypes for *S. Typhimurium* count between, while the TC genotype had higher IgA and IgM antibody titres than CC in ½F½R crossbred.

Figure 3. Generalized least square means for immune traits as affected by SNP genotypes of the *Gal3* gene in all studied populations. R= Rhode Island Red breed; ½R½F = Rhode Island Red × Fayoumi; ½F½R= Fayoumi × Rhode Island Red; ns = non-significant; * = significant differences at $p < 0.05$; cfu= colony forming units; OD= optical density.



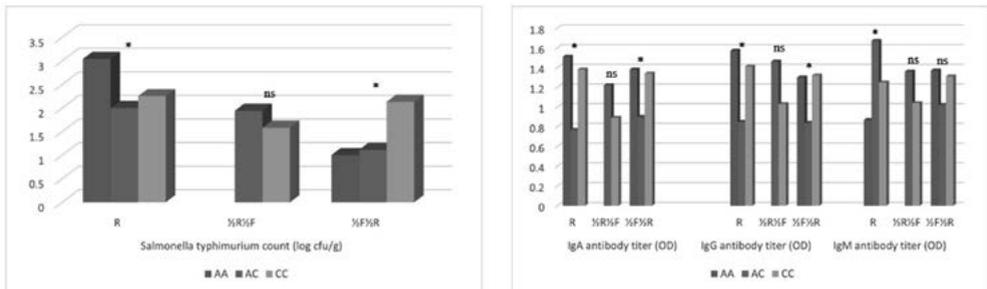
The SNP genotypes of *Gal4* gene were associated significantly with *S. Typhimurium* count and IgA, IgG and IgM antibody titres (Figure 4). The genotype GG had lower *S. Typhimurium* count and higher IgA, IgG and IgM antibody titres than AA genotype in R breed. There were not significant differences between the genotypes of *Gal4* for *S. Typhimurium* count in ½R½F crossbred, while, the genotype AG had higher significant IgA, IgG and IgM antibody titres than AA and GG genotypes in ½R½F crossbred. There were not significant differences between the AG and GG genotypes for *S. Typhimurium* count and IgA, IgG and IgM antibody titres in ½F½R crossbred.

Figure 4. Generalized least square for immune traits as affected by SNPs genotypes of *Gal4* gene in all studied populations. R= Rhode Island Red breed; $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ = Rhode Island Red \times Fayoumi; $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ = Fayoumi \times Rhode Island Red; ns = non-significant; * = significant differences at $p < 0.05$; cfu = colony forming unit; OD = optical density.



There were significant associations between the genotypes of *Gal5* gene and *S. Typhimurium* count, and IgA, IgG, and IgM antibody titres (Figure 5). The genotype CC had significant lower *S. Typhimurium* count, and higher IgA and IgG antibody titres in R breed. Significant differences between the genotypes of *Gal5* were not observed for *S. Typhimurium* count, and IgA, IgG, and IgM antibody titres in $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ crossbred. The birds with AA genotype had lower significant *S. Typhimurium* count, and higher IgA and IgG antibody titres in $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ crossbred.

Figure 5. Generalized least square means for immune traits as affected by SNPs genotypes of *Gal5* gene in all studied populations. R= Rhode Island Red breed; $\frac{1}{2}R\frac{1}{2}F$ = Rhode Island Red \times Fayoumi; $\frac{1}{2}F\frac{1}{2}R$ = Fayoumi \times Rhode Island Red; ns = non-significant; * = significant differences at $p < 0.05$; cfu = colony forming unit; OD = optical density.



DISCUSSION

The generalized least square means indicated that the F breed had lower *S. Typhimurium* count and higher antibody titres. These findings revealed that the F breed was more resistant to *Salmonella* than the R breed. Gebrerufael et al. (2015) reported that there was a difference in the susceptible to salmonellosis between the local and F breeds, and the Koekoek breed had a significantly higher *S. Typhimurium* count than the local and F breeds. In comparison to Leghorn and other breeds, the F are regarded less vulnerable to several poultry infections such as *Salmonella* spp., *Eimeria*

spp., Marek's disease virus and avian influenza virus (Cheeseman, 2007; Schilling et al., 2019). All those suggests that crossing F and R breeds could improve the immunity responses in broilers against *S. Typhimurium*. The estimates of heterosis previously reported by Iraqi et al. (2011) indicated significant reduction in *Salmonella* cells count associated with significant increase in antibody titers at 4th week of age. The current research specifically investigated the polymorphic associations of four *Gal* genes to caecal *S. Typhimurium* count and antibody titers in F, R, ½F½R and ½R½F chickens. Those genes are functionally equivalents to the mammalian beta-defensins and are crucial for chickens' innate defenses against bacterial pathogens (Hasenstein et al., 2006). There were significant differences between the genotypes of *Gal3*, *Gal4* and *Gal5* gene for *S. Typhimurium* count, and IgA, IgG, and IgM antibody titers in R, ½F½R and ½R½F chickens. Hasenstein and Lamont (2007) demonstrated that *Gall*, *Gal2*, *Gal4*, *Gal7*, *Gal8*, *Gal9* and *Gal10* had no significant relationships with caecal bacterial load in chicks from an intercross line. Zhang et al. (2020) found that the five SNPs detected in *Gal5* were strongly associated with sensitivity to *Salmonella* spp. The association among haplotypes and IgA, IgG and IgM antibody titers against *S. Typhimurium* may provide useful information to select chicks with superior adaptive immune response. According to the reported findings, the genotypes of the *Gal3*, *Gal4* and *Gal5* genes could be utilized for marker-assisted selection in breeding strategies, one of which was to increase hens' resistance to *S. Typhimurium*.

CONCLUSION

Crossing F and R resulted in a favorable heterotic reduction in *S. Typhimurium* bacteria load. The ½R½F cross might be utilized to boost chick resistance against *S. Typhimurium*, which would be accompanied by higher antibody titers and lower *S. Typhimurium* colonization. The molecular associations indicated that utilizing the SNP markers (T222C, A188G, and C80A in the *Gal3*, *Gal4*, and *Gal5* genes, respectively) may aid in the identification of genotypes with the best potential for improving chicken immune traits against *S. Typhimurium* and growth performance.

REFERENCES

1. Ardiyana M, Gunawan A, Murtini S, Sartika T and C Sumantri. (2020). Polymorphisms and associations of the NRAMP-1 and iNOS genes on Newcastle disease and Salmonella enteritidis resistances in SenSi-1 Agrinak chickens. *Trop. J. Anim. Sci.* 43(2): 95–102.
2. Cheeseman JH. (2007). Breed effect on early cytokine mRNA expression in spleen and cecum of chickens with and without Salmonella enteritidis infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31: 52–60.
3. Ganz T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3(9): 710–720.
4. Gast RK. (1997). Detecting infections of chickens with recent Salmonella pullorum isolates using standard serological methods. *Poult. Sci.* 76(1): 17–23.
5. Gebrerufael G, Mahendra P, Tadelle D, Tesfaye S and W Alehegn. (2015). Evaluating the relative resistance of different poultry breeds to Salmonella Typhimurium. *Afr. J. Agric. Res.* 10(30): 2928–2939.
6. Hasenstein JR and SJ Lamont. (2007). Chicken gallinacin gene cluster associated

- with Salmonella response in advanced intercross line. *Avian Dis.* 51(2): 561–567.
7. Hasenstein JR, Zhang G and SJ Lamont. (2006). Analyses of five gallinacin genes and the Salmonella enterica serovar Enteritidis response in poultry. *Infect. Immun.* 74(6): 3375–3380.
 8. Higgs R, Lynn DJ, Gaines S, McMahon J, Tierney J, James T, Lloyd AT, Mulcahy G and C O'Farrelly. (2005). The synthetic form of a novel chicken β -defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens. *Immunogenetics*, 57(1): 90–98.
 9. Iraqi MM, Hanafi M, El-Moghazy GM, El-Kotait A and MHA Abd A'al. (2011). Estimation of crossbreeding effects for growth and immunological traits in a crossbreeding experiment involving two local strains of chickens. *Livestock Research for Rural Development.* 23(4).
 10. Kramer J, Malek M and SJ Lamont. (2003). Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with Salmonella enteritidis in poultry. *Anim. Genet.* 34(5): 339–348. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2052.2003.01027.X>
 11. Legarra A, Calenge F, Mariani P, Velge P and C Beaumont. (2011). Use of a reduced set of single nucleotide polymorphisms for genetic evaluation of resistance to Salmonella carrier state in laying hens. *Poult. Sci.* 90(4): 731–736.
 12. Li X, Nie C, Zhang Z, Wang Q, Shao P, Zhao Q, Chen Y, Wang D, Li Y and W Jiao. (2018). Evaluation of genetic resistance to Salmonella Pullorum in three chicken lines. *Poult. Sci.* 97(3): 764–769.
 13. Saleh MS, Khalil MH, Iraqi MM and A Camarda. (2021). Molecular associations of gallinacin genes with immune response against Salmonella typhimurium in chickens. *Livest. Sci.* 244: 104315.
 14. Saleh MS, Khalil MH, Iraqi MM and A Camarda. (2022). Crossbreeding impacts on caecal bacterial count and antibody titres in chickens. *Br. Poult. Sci.* 63(2): 150–153. <https://doi.org/10.1080/00071668.2021.1966755>
 15. Schilling MA, Memari S, Cavanaugh M, Katani R, Deist MS, Radzio-Basu J, Lamont, SJ, Buza JJ and V Kapur. (2019). Conserved, breed-dependent, and sub-line-dependent innate immune responses of Fayoumi and Leghorn chicken embryos to Newcastle disease virus infection. *Sci. Rep.* 9(1): 1–10.
 16. Sugiarto H and PLYu. (2004). Avian antimicrobial peptides: the defense role of β -defensins *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323(3): 721–727.
 17. Wakchaure R, Ganguly S, Praveen PK, Kumar A, Sharma S and T Mahajan. (2015). Marker assisted selection (MAS) in animal breeding: a review. *J. Drug. Metab. Toxicol.* 6(5): e127.
 18. Xiao Y, Hughes AL, Ando J, Matsuda Y, Cheng JF, Skinner-Noble D and G Zhang. (2004). A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics.* 5(1): 1–11.
 19. Yang B, Niu Q, Yang Y, Dai P, Yuan T, Xu S, Pan X and G Zhu. (2019). Self-made Salmonella Pullorum agglutination antigen development and its potential practical application. *Poult. Sci.* 98(12): 6326–6332.
 20. Zhang LY, Huang MY, Li Y, Chen DZ and X Shi. (2020). Association of three beta-defensin gene (AvBD4, AvBD5, AvBD14) polymorphisms with carrier-state susceptibility to salmonella in chickens. *Br. Poult. Sci.* 61(4): 357–365.

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI IMMUNOISTOCHEMICA PER RIEMERELLA ANATIPESTIFER A FINI DIAGNOSTICI

Zanardello C.¹, Bano L.², Drigo I.², Bonfante F.³, Gobbo F.³, Zandonà L.², Vascellari M.¹

¹ *Diagnostica specialistica e istopatologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD);*

² *Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4 int. 5/6, 31020 Fontane di Villorba (TV);*

³ *Virologia speciale e sperimentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD).*

Summary

Riemerella anatipestifer (RA) is a rod-shape, non-spore forming, non-motile, gram-negative pathogen that infects many species of birds, especially goose, ducks and turkeys. Chickens, pheasant and wild birds can also be affected. RA occurs as an acute or chronic infection characterized by a severe polyserositis with fibrinous pericarditis, perihepatitis, airsacculitis and meningitis. RA is a worldwide pathogen that causes important economic damages in poultry industry due to the high mortality rate and the costs linked to antimicrobial treatments. The presence of 21 serotypes of RA represents an issue both for the diagnosis and the control of the disease. The diagnostic tools actually available not always permit to give a reliable and quick diagnosis.

In order to investigate the disease caused by RA, we developed an antibody to be used for immunohistochemistry (IHC) and validated an IHC protocol to detect RA antigens in tissue sections.

For the experimental protocol, ten 1-day-old turkeys, declared not vaccinated for RA, were intravenously (IV) infected with RA serotype 1, which results the most common serotype responsible for recurrent outbreaks of the disease in Italian poultry flocks. Five days post-infection, the animals were euthanized. All the subjects underwent to gross examination during which swabs were performed from the air sacs and joints and submitted in pools for PCR. From all animals, samples of the pericardium, lung, liver, spleen, brain and joints were collected and routinely processed for histopathology and IHC. The IHC was performed using the automatic immunostainer BenchMark Ultra (Ventana, Roche). The slides were incubated with the polyclonal anti-*Riemerella* serotype 1 antibody, produced in rabbits, at a dilution of 1:2000 for 32 minutes at room temperature. Tissue sections from naturally infected animals (positive control) and from three Specific Pathogen Free (SPF) turkeys, not infected (negative control), were included in each run. Histologically all the subjects showed multifocal to diffuse heterophilic infiltration with fibrinous exudation in meninges, synovial membranes, pericardium and splenic serosa. The liver and lung samples showed diffuse oedema and vascular congestion with the presence of intravascular fibrinous thrombi. IHC positivity was revealed in the fibrinous heterophilic exudate in the spleen of all the subjects, in the 8/10 pericardium, 8/10 lungs, 5/10 liver, 9/10 meninges and 9/10 synovial membranes. All the tissues from uninfected animals (negative con-

trol) were IHC negative.

The results obtained in this study suggest that the correlation between IHC, clinical signs and anatomo-histopathological lesions permits to quickly confirm the presence of RA in the farm allowing the vet to undertake the most appropriate treatment for the animals.

INTRODUZIONE

Riemerella anatipestifer (RA) è un batterio bastoncellare, non sporigeno, immobile, Gram negativo patogeno primario per molte specie avicole, nelle quali causa infezioni sia acute sia croniche con pesanti conseguenze per il settore avicolo (Ruiz and Sandhu, 2013), dovute agli elevati tassi di mortalità, scarti alla macellazione, riduzione dell'indice di conversione alimentare e costi legati all'utilizzo di antimicrobici per contenere la malattia.

L'agente eziologico RA causa polisierositi fibrino-eterofiliche in diverse specie di avicoli in particolar modo anatre, oche e tacchini (Sandhu, 2003), ma è stato segnalato anche in altre specie di uccelli quali polli, fagiani e volatili selvatici (Wobeser and Ward, 1974). Gli animali giovani sono più vulnerabili, con differenze legate alla specie, e la malattia si riscontra in generale entro le 10 settimane d'età. La trasmissione di RA sembra avvenire principalmente per via aerogena e tramite ferite cutanee; tuttavia carenze nutrizionali, stress, condizioni climatiche avverse e patologie concomitanti (Rubbenstroth et al., 2009) potrebbero rappresentare fattori predisponenti, soprattutto in soggetti molto giovani (Chang et al., 2019). Le lesioni anatomopatologiche, sovrapponibili in tutte le specie colpite, consistono principalmente in perisplenite, periepatite, aerosacculite, artrosinovite e meningite fibrinosa (Gyuris et al., 2018).

Gli strumenti attualmente disponibili per la prevenzione ed il contenimento della malattia sono l'immunizzazione degli animali tramite vaccinazione, le buone pratiche d'allevamento e l'utilizzo corretto di antimicrobici. La presenza di almeno 21 sierotipi di RA (Ruiz & Sandhu, 2013), l'elevata variabilità antigenica degli stessi e la scarsa cross-protezione del vaccino, rendono tuttavia quest'ultimo poco applicabile nella pratica quotidiana a meno che non si sia sierotipizzato il ceppo circolante. Elevate misure di biosicurezza e il corretto utilizzo di antimicrobici diventano quindi indispensabili per prevenire e controllare la malattia. In presenza di malattia in allevamento, l'isolamento e l'identificazione di RA risultano cruciali per una corretta diagnosi, sebbene studi precedenti abbiano evidenziato alcuni limiti identificativi delle metodiche di laboratorio attualmente in uso, dovuti alla vicinanza filogenetica con specie microbiche dello stesso genere o di generi affini (Hess et al., 2013), ipotizzando anche un legame con la fase di infezione (Pickrell, 1996).

Dal punto di vista anatomopatologico RA causa lesioni anatomopatologiche molto caratteristiche, ma non patognomoniche, che devono essere poste in diagnosi differenziale con altri batteri che possono causare quadri patologici simili. Diagnosi differenziali includono colibacillosi, salmonellosi, pasteurellosi e streptococchi (Chikuba et al., 2016).

Ad oggi non esistono in commercio anticorpi utilizzabili in immunostochimica (IHC) che consentano di identificare RA nel contesto delle lesioni anatomopatologiche.

Lo scopo di questo lavoro è stato mettere a punto un protocollo di IHC che possa affiancare la valutazione anatomopatologica delle lesioni in animali sintomatici. Questo lavoro è parte di uno studio più ampio (Progetto di Ricerca Corrente IZS VE 14/16) che ha preso in esame diversi aspetti dell'infezione da RA attraverso diverse fasi progettuali.

MATERIALI E METODI

Fase sperimentale

Dieci tacchini ibridi Aviagen di 1 giorno, figli di riproduttori dichiarati non vaccinati per RA, sono stati stabulati in isolatori a ventilazione forzata attraverso filtri HEPA, contenenti ciascuno 5 soggetti. Da ciascun soggetto è stato effettuato un tampone tracheale da sottoporre a PCR per RA sia all'arrivo che all'età di 14, 41 e 54 giorni. Al 54° giorno di vita, gli animali sono stati infettati per via endovenosa (EV) con un ceppo di RA di campo sierotipo 1 ST 46, che risulta epidemico negli allevamenti di tacchini da carne italiani (Bano et al., 2020). Il titolo degli inoculi batterici utilizzati per l'infezione era pari a 10^9 UFC/mL, ottenuto su 1 ml di soluzione fisiologica. Dopo l'infezione gli animali sono stati monitorati per 5 giorni e sono stati registrati eventuali sintomi clinici/mortalità. Al quinto giorno post infezione gli animali ancora in vita sono stati soppressi. Al termine della prova tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame anatomo-patologico nel corso del quale sono stati eseguiti tamponi dai sacchi aerei e dalle articolazioni tibio-tarso-metatarsali, da sottoporre, in pool per gruppo sperimentale, a ricerca RA tramite PCR.

Indagini istopatologiche ed immunoistochimiche (IHC)

Da tutti i soggetti sono stati prelevati campioni di pericardio, polmone, fegato, milza, cervello e articolazioni da sottoporre ad indagine istopatologica. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata 10% per un tempo compreso tra 24 e 72 ore, routinariamente processati e inclusi in paraffina. Sezioni di tessuto di 3 μ m sono state colorate in ematossilina eosina e valutate istologicamente.

Su sezioni di tessuto di 4 μ m è stata condotta l'indagine immunoistochimica utilizzando l'immunocoloratore automatico

BenchMark Ultra (Ventana, Roche). Per lo smascheramento antigenico è stato utilizzato benchmarck ULTRA Cell Conditioning Solution CC2 pH 6.0 a 91°C per 24 minuti; successivamente i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo policlonale anti -Riemerella sierotipo 1 prodotto in coniglio [applicando protocolli consolidati disponibili in letteratura (Bisgaard M., 1982). La produzione è avvenuta sulla base dell'autorizzazione n° 124/2019-PR del 12/2/2019 rilasciata dal Ministero della Sanità, Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari], alla diluizione di 1:2000 per 32 minuti a temperatura ambiente. Come sistema di rivelazione e cromogeno è stato utilizzato l'UltraView Universal DAB detection Kit, della ditta Roche (cod. 052697806001). Come contro-colorazione è stata usata Ematossilina per 8 minuti.

In ogni corsa sono state inserite sezioni di tessuto da animale con infezione naturale da RA confermata (controllo positivo) e sezioni di tessuto di tre tacchini Specific Pathogen Free (SPF), non infettati (controllo negativo).

RISULTATI

I tamponi tracheali di tutti i soggetti sono risultati negativi alla PCR per RA indipendentemente dal giorno del campionamento. La PCR eseguita sui pools di tamponi eseguiti dai sacchi aerei e dalle articolazioni prelevati in sede autoptica, è risultata positiva.

Dopo 24 ore dall'inoculazione EV, tutti i soggetti presentavano debolezza, abbattimento, riluttanza al movimento e diarrea.

A 48 ore dall'infezione, oltre ai sintomi precedentemente descritti, due animali dello stesso isolatore manifestavano incoordinazione e tumefazione dell'articolazione tibio-tarso-metatarsale sx, rispettivamente; nell'altro isolatore un solo soggetto manifestava incoordinazione e depressione del sensorio.

A 72 ore post infezione un soggetto presentava atteggiamento a "cane seduto" con arti inferiori distesi in avanti.

All'esame autoptico tutti i soggetti presentavano artrosinoviti fibrino-eterofiliche bilaterali delle articolazioni tibio-tarsiche, epato- e splenomegalia (eccetto due soggetti), pericardite fibrinosa, opacizzazione dei sacchi aerei talvolta con iniziale essudazione fibrinosa, sinusite e tracheite catarrale. Non sono state osservate lesioni macroscopiche a carico degli altri organi.

L'indagine istopatologica ha evidenziato in tutti i soggetti, da multifocale a diffusa infiltrazione eterofilica con essudazione fibrinosa e presenza di più rari macrofagi, a carico di meningi, membrane sinoviali, pericardio e sierosa splenica. I campioni di fegato e polmone presentavano diffuso edema e congestione vasale con presenza di trombi fibrinosi endovasali. L'indagine IHC ha evidenziato immunopositività a carico dei focolai di flogosi fibrino eterofilica nella milza (10/10 soggetti), cuore e pericardio (8/10 soggetti), polmone (8/10 soggetti), fegato (5/10 soggetti), meningi (9/10 soggetti) e membrane sinoviali (9/10 soggetti). Tutti i campioni di controllo negativo (tessuti da animali non infettati) sono risultati negativi all'indagine IHC.

DISCUSSIONE

RA è un patogeno diffuso a livello mondiale che anche in Italia ha dato origine ad epidemie che ad ondate hanno causato importanti perdite economiche per il settore avicolo legate sia ai danni zootecnici sia all'impiego di farmaci per contenere la patologia. Nell'ultimo decennio si è assistito a ondate epidemiche che hanno avuto il loro apice nel 2015, anno in cui si è ricorso anche all'utilizzo di vaccini stabulogeni per l'immunizzazione massiva degli animali. L'efficacia della vaccinazione dipende, oltre che dal protocollo utilizzato, anche dalla conoscenza del sierotipo circolante in quel momento nell'allevamento. La sierotipizzazione di conseguenza pur rimanendo strumento fondamentale ed indispensabile per lo sviluppo di vaccini necessari alla lotta alla malattia, deve poter essere affiancata da metodiche diagnostiche sensibili e rapide, di facile utilizzo nella pratica quotidiana, e che non risentano di eventuali trattamenti antimicrobici somministrati agli animali.

La polisierosite fibrino eterofilica causata da RA, pur essendo fortemente indicativa di malattia, non può essere considerata comunque patognomonica e devono essere considerate in diagnosi differenziale altre cause batteriche.

La messa a punto di un protocollo di IHC ha consentito, negli animali oggetto di

sperimentazione, di evidenziare la presenza del patogeno nelle lesioni riscontrate, attraverso una forte risposta immuno-cromogenica all'anticorpo utilizzato.

In questo lavoro, la positività all'IHC è stata riscontrata infatti nella maggioranza dei soggetti infettati negli organi ritenuti *target* come dimostrato da studi precedenti (milza, sinovia, meningi, pericardio, polmoni e fegato).

I polmoni ed il fegato, pur non presentando lesioni istopatologicamente significative, hanno evidenziato una buona (8/10 e 5/10 rispettivamente) positività immunostochimica a carico dei trombi vasali.

Considerati i diversi distretti anatomici interessati dall'infezione da RA e la scarsa efficacia, in particolare per alcune localizzazioni, dei farmaci antibatterici maggiormente in uso negli avicoli, la profilassi vaccinale è da preferire sicuramente ad un approccio terapeutico. Tuttavia elevate misure di biosicurezza e l'utilizzo di antimicrobici risultano indispensabili nelle prime fasi della malattia, per contenerne la diffusione.

Gli ottimi risultati ottenuti dalla prova sperimentale consentono di poter affermare che l'IHC può essere ritenuta una metodica sensibile, poco costosa e di più rapida esecuzione rispetto ad esempio all'esame colturale che, peraltro, può anche risentire negativamente di eventuali trattamenti antimicrobici. Inoltre, rispetto alla PCR, l'IHC consente di localizzare la presenza del patogeno nelle lesioni istopatologiche, non limitandosi solo alla presenza del materiale genetico.

CONCLUSIONE

Il protocollo IHC messo a punto in questo studio consente quindi la correlazione tra sintomatologia clinica, lesioni anatomo-istopatologiche e IHC, permettendo in tempi rapidi di confermare la presenza di RA, sierotipo 1, in allevamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Ruiz J.A. & Sandhu T. (2013). *Riemerella anatipestifer* infection. Disease of Poultry, 13th ed. (Swayne, D. E. ed.) Wiley Blackwell publishing, Ames, pp. 823-828.
2. Sandhu T.S. (2003). *Riemerella anatipestifer* infection. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Gilsson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), Diseases of Poultry 11th edn. pp. 676682.
3. Wobeser G. & Ward G.E. (1974). *Pasteurella anatipestifer* infection in migrating whistling swans. Journal of Wildlife Diseases, 10, 466470.
4. Rubbenstroth D., Ryll M., Behr K.P. & Rautenschlein S. (2009). Pathogenesis of *Riemerella anatipestifer* in turkeys after experimental mono-infection via respiratory routes or dual infection together with the avian metapneumovirus. Avian Pathology, 38:6, 497-507.
5. Chang F.F., Chen C.C., Wang S.H. & Chen C.L. (2019). Epidemiology and antibiogram of *Riemerella anatipestifer* isolated from waterfowl slaughterhouses in Taiwan. J Vet Res 63.
6. Gyuris E., Nemes C. & Magyar T. (2018). Data on the epidemiology and pathology of *anatipestifer* disease in Hungary (2010-2014). Acta Vet Hung 66(3):350-364.
7. Hess C., Enichlmayr H., Jandreski-Cvetkovic D., Liebhart D., Bilic I. & Hess M. (2013). *Riemerella anatipestifer* outbreaks in commercial goose flocks and

- identification of isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *Avian Pathology* 42(2):151-6.
8. Pickrell J.A. (1966). Pathologic changes associated with experimental *Pasteurella anatipestifer* infection in ducklings. *Avian Disease* 10: 281-288.
 9. Chikuba T., Uehara H., Fumikura S., Takahashi K., Suzuki Y., Hoshinoo K. & Yamamoto Y. (2016). *Riemerella anatipestifer* infection in domestic ducks in Japan, 2014. *J Vet Med Sci* 78(10): 1635-1638.
 10. 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. (2020). Caratterizzazioni genotipiche e fenotipiche di ceppi di *Riemerella anatipestifer* isolati dal pollame in Italia. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria*, pp. 45-51.
 11. Bisgaard M., (1982). Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination. *Avian Pathology* 11:341-350

RILIEVI CLINICI, ANATOMOPATOLOGICI E DIAGNOSTICI RACCOLTI NEL CORSO DELLA MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELLA RIEMERELLOSI NEL TACCHINO DA CARNE

Zandonà L.¹, Rizzardi A.¹, Guolo A.¹, Tonon E.¹, Drigo I.¹, Gobbo F.², Bonfante F.², Terregino C.², Bano L.¹

¹ Sezione Diagnostica di Treviso, IZS delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba, Treviso;

² Virologia Speciale e Sperimentazione, IZS delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro, Padova.

Summary

In order to investigate the protective effects of vaccines to prevent riemerellosis in turkeys, a reliable experimental model for the reproduction of the disease is needed. In the present study, we tried to reproduce the clinical signs and lesions through different infection routes: intramuscular (IM), ocular conjunctival (OC) and intravenous (IV). A field strain of *Riemerella anatipestifer* (RA) serotype 1, sequence type (ST) 46, considered epidemic in Italian meat-turkey flocks, was used for the inoculation preparations. The IM and OC routes failed to produce signs or macroscopic lesions, and attempts to reisolate the organism were unsuccessful. However, RA was detected by PCR in tracheal swabs collected at the end of the trial from birds inoculated via the OC but not via IM route. Typical clinical signs and lesions were seen only in the turkeys given intravenously inoculation at 57 days of age.

Serological investigations performed through an indirect ELISA developed *in house* showed that anti-RA antibodies increased in one week post-infection in both OC and IM groups, but in the latter, the antibody titre decreased more quickly than for OC group. This observation could be due to the prolonged persistence of RA in the upper respiratory tracts of birds given OC inoculation.

In conclusion, we were able to set up an experimental model for the reproduction of the typical clinical signs and lesions riemerellosis in turkeys via the IV route. The developed ELISA test might be applied in the future to study the immune response to vaccines and to evaluate the formation of turkey flocks RA-free.

INTRODUZIONE

Riemerella anatipestifer (RA) (ex *Pasteurella anatipestifer*), è un cocco-bacillo Gram-negativo, immobile, catalasi e ossidasi positivo, appartenente alla famiglia delle *Flavobacteriaceae*.

La prima segnalazione di tale microrganismo risale all'inizio del secolo scorso, associata a una grave polisierosite degli anatidi (Riemer, 1904). Oggi la malattia è da considerarsi cosmopolita ed esistono moltissime segnalazioni in diverse specie di pollame allevato, sebbene queste provengano principalmente dal continente asiatico e riguardino gli 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 sintoma-

tologia 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 caratterizzata da tremori del capo, incoordinazione 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 & Pascucci, 1983).

Nell'ultimo decennio si è assistito a ondate epidemiche di riemerellosi nel comparto del tacchino da carne di difficile spiegazione, che hanno avuto il loro apice nel 2015, anno in cui si è ricorso anche a immunizzazione massiva dei gruppi con vaccini stabulogeni.

Tali ondate hanno coinciso con l'introduzione nel nostro paese di un ceppo epidemico appartenente al sierotipo 1 e al sequence type (ST) 46, che negli ultimi anni ha sostituito completamente i ceppi precedentemente circolanti nel comparto del tacchino da carne (Bano et al., 2020).

Purtroppo la messa a punto di presidi immunizzanti efficaci nel contrastare la malattia è complicata dalla mancanza di un modello di riproduzione sperimentale nel tacchino. Con il presente studio si è voluto proprio studiare un modello di riproduzione sperimentale della riemerellosi in tacchini da carne infettati attraverso varie vie d'inoculazione. Nel corso della sperimentazione è stato possibile mettere a punto alcuni strumenti diagnostici che potranno risultare utili nell'applicazione di nuove strategie finalizzate al contenimento della riemerellosi in allevamento.

Questo lavoro è parte di uno studio più ampio (Progetto di Ricerca Corrente IZS VE 14/16) dal titolo "Potenziamento delle strategie di prevenzione e controllo della riemerellosi del pollame attraverso caratterizzazioni fenotipiche e genotipiche dei ceppi circolanti in Italia".

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

La sperimentazione animale di seguito descritta è avvenuta sulla base dell'autorizzazione n° 115/2014-PR del 19/12/2014 rilasciata dal Min. della Sanità, Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari.

Cinquanta tacchini da carne commerciali femmina B. U. T. 6 (Aviagen) provenienti da riproduttori non vaccinati per riemerellosi, a un giorno di vita sono stati stabulati a gruppi di 5 in isolatori a ventilazione forzata attraverso filtri HEPA. Gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali: il primo era costituito da 20 soggetti infettati per via intramuscolare (gruppo IM), il secondo da 20 soggetti sottoposti ad infezione per via oculo-congiuntivale (gruppo OC), mentre il terzo era il gruppo "controllo" (gruppo "C") costituito da 10 soggetti non sottoposti ad alcuna infezione.

L'infezione sperimentale è avvenuta a 34 giorni impiegando un ceppo di campo appartenente al sierotipo "1" ST 46, che risulta epidemico negli allevamenti di tacchini da carne italiani (Bano et al., 2020).

Nel gruppo "IM" l'infezione è avvenuta somministrando nel muscolo pettorale 1 mL di soluzione batterica con concentrazione pari a 10^9 UFC/mL, ottenuta in soluzione fisiologica (Smith et al., 1987). Nel gruppo OC sono stati somministrati 0,1 mL nel sacco lacrimale di un occhio e 0,1 in quello dell'occhio controlaterale, di una soluzione batterica con titolo analogo a quello descritto per il gruppo "IM". Ai soggetti

del gruppo controllo è stata somministrata soluzione fisiologica sterile sia per via intramuscolare che oculo-congiuntivale, con le stesse modalità descritte per i gruppi infettati sperimentalmente.

I soggetti sono stati monitorati dal punto di vista clinico quotidianamente sino al termine della sperimentazione conclusasi il 56° giorno di vita per i gruppi OC e IM. Il giorno seguente a tale data, il gruppo controllo composto da 10 soggetti, è stato infettato per via endovenosa con inoculi allestiti allo stesso modo di quelli impiegati per l'infezione IM.

Campionamento

All'arrivo e nei giorni 14, 41 e 54 sono stati eseguiti tamponi tracheali da tutti i soggetti e processati in pool da 5 per la presenza di RA attraverso PCR (Christensen & Bisgaard, 2010). Il giorno dell'arrivo, prima della suddivisione in gruppi sperimentali, è stato eseguito un prelievo di sangue da 5 soggetti. Un prelievo di sangue è stato eseguito anche nei giorni 14, 32, 40, 47 e 54 da tutti i soggetti dei gruppi sperimentali. Il siero ottenuto è stato sottoposto alla ricerca di anticorpi prodotti nei confronti di RA mediante un metodo ELISA sviluppato *in house*, come descritto di seguito.

Gli animali dei gruppi OC e IM sono stati sacrificati il giorno 56 mentre il gruppo EV è stato soppresso dopo 5 giorni dall'infezione (62 gg). Tutti gli animali sono stati sottoposti ad esame anatomico-patologico nel corso del quale sono stati eseguiti tamponi dai sacchi aerei e dalle articolazioni da sottoporre a ricerca RA tramite PCR. In sede autoptica sono stati condotti accertamenti batteriologici da sacco aereo, cervello, polmone, fegato, milza e articolazione tibio-tarso-metatarsale. Porzioni di organi sono stati fissate in formalina tamponata 10% per la valutazione istopatologica e per lo sviluppo di un test in immunoistochimica per la rilevazione di RA i cui risultati saranno oggetto di altra comunicazione.

Accertamenti batteriologici

L'esame è stato eseguito inoculando con i campioni prelevati asepticamente piastre di agar sangue (AS) e brain heart infusion broth (BHI). I terreni sono stati incubati tutti a 35 ± 2 °C in condizioni di microaerofilia. Le piastre di AS sono state ispezionate a 24 e 48 ore e, in caso di negatività, dopo 24 ore si è proceduto all'esecuzione dell'esame batteriologico indiretto a partire da BHI. A tale fine, i BHI sono stati seminati su nuove piastre di agar sangue utilizzando tamponi cotonati sterili e le piastre sono state incubate a 35 ± 2 °C in condizione di microaerofilia e ispezionate dopo 24 e 48 ore. In caso di crescita le colture sono state identificate mediante MALDI TOF MS (Bruker, Daltonics).

Sierologia

Per la rilevazione di anticorpi anti-RA è stato sviluppato un test ELISA indiretto *in house*. L'antigene era costituito da un estratto dei lipopolisaccaridi (LPS) di una coltura di RA sierotipo "1" ST 46, ottenuta in apparato da dialisi impiegando una membrana con cut-off di 15 kDa immersa in 800 mL di Veal Broth, mantenuto in agitazione mediante magnete. Dopo 24 ore la brodocoltura è stata raccolta e sottoposta ad estrazione dei lipopolisaccaridi come descritto in letteratura (Eugene e Hackett, 2000).

Le concentrazioni di antigene (lipopolisaccaride), siero da analizzare e coniugato

descritte di seguito, sono state scelte sulla base di classiche prove di ottimizzazione dei reagenti di un test ELISA indiretto (Crowter, 2009).

Piastre Maxisorp NUNC-immunoplate (Nunc) sono state incubate con 100 μ L/pozzetto per 1,5 ore a 37 °C impiegando una concentrazione di antigene pari a 1:600, diluito in tampone carbonato 0,05 M a pH 9,6. Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate 3 volte con 300 μ L/pozzetto di PBS addizionato con lo 0,05% di Tween 20 (PBS-T). I siti aspecifici sono stati bloccati mediante incubazione per 1 ora a 37 °C con 200 μ L/pozzetto di una soluzione di bloccaggio (BB) costituita da PBS-T addizionato con 5% di latte in polvere (Sigma Aldrich) e di EDTA 0,5 mM. Le piastre sono state nuovamente lavate ed incubate per 1h a 37 °C con 100 μ L dei sieri in esame diluiti 1:100 in PBS-T addizionato con l'1% di BSA e con 0,5 mM di EDTA (Dilution Buffer, DB). I controlli positivi erano costituiti da sieri di tacchini vaccinati 2 volte con vaccino commerciale (sierotipo "1") mentre come controlli negativi sono stati impiegati sieri di soggetti non vaccinati e che non hanno sperimentato la malattia. Dopo incubazione le piastre sono state ulteriormente lavate come sopra descritto ed incubate per 1 ora a 37 °C con l'anticorpo Anti-Turkey IgY associato a perossidasi (Abcam), diluito 1:800. Al termine dell'incubazione dopo 3 lavaggi con 300 μ L/pozzetto di PBS-T sono stati aggiunti 100 μ L di 1-StepTM ABTS (Thermo Scientific). Dopo 30 minuti di incubazione in leggera agitazione la reazione è stata stoppata aggiungendo 100 μ L di una soluzione all'1% di SDS (sodio-dodecil solfato) e la lettura è stata eseguita impiegando uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati ottenuti sono stati normalizzati rispetto ai controlli ed espressi in valore S/P (Sample to Positive Ratio) che corrisponde al valore della densità ottica del campione considerato in rapporto ai valori degli standard positivo e negativo inseriti nella piastra ed espresso in percentuale.

RISULTATI

Nel corso della sperimentazione gli unici segni clinici osservati nei gruppi OC e IM sono stati a carico dell'apparato locomotore ed erano caratterizzati da sporadiche zoppie intermittenti di grado variabile, indipendentemente dalla via d'infezione, mentre nel gruppo controllo non è stata segnalata alcuna sintomatologia. Due giorni dopo l'infezione per via EV, tutti i soggetti manifestavano debolezza degli arti inferiori, riluttanza al movimento e diarrea. Il terzo giorno, 3/10 soggetti si presentavano in decubito laterale con grave depressione del sensorio mentre un quarto soggetto mostrava incoordinazione e tumefazione dell'articolazione tibio-tarso-metatarsale. Il quinto giorno (62 gg.) tutti i soggetti, ad eccezione di 2, manifestavano sintomatologia neurologica caratterizzata da depressione del sensorio, assenza di risposta agli stimoli o stato comatoso e per tale ragione si decideva di sacrificare tutti i soggetti del gruppo.

All'esame anatomo-patologico eseguito al termine della prova non sono state osservate lesioni macroscopicamente evidenti in alcuno dei soggetti appartenenti ai gruppi OC e IM, mentre nel gruppo infettato per via EV erano presenti artro-sinoviti fibrino-eterofile bilaterali, epato-splenomegalia, pericarditi fibrinose con iniziali fenomeni di neo-vascolarizzazione, opacamento dei sacchi aerei con rare organizzazioni fibrinose, sinusiti catarrali ed enteriti di grado variabile da lieve a moderato.

Gli accertamenti batteriologici eseguiti al termine della sperimentazione su organi e tessuti dei gruppi OC e IM hanno dato esito negativo mentre quelli del gruppo EV sono riportati in tabella 2.

All'arrivo tutti i soggetti sono risultati negativi alla PCR per RA, condotta da tampone tracheale. I risultati alla stessa analisi ottenuti nel corso della sperimentazione vengono riportati in tabella 1.

Età	14 gg.				41 gg.				54 gg.			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pool	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Gruppo IM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Gruppo OC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controllo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 1. Risultati della PCR per RA applicata ai tamponi tracheali eseguiti durante la sperimentazione.

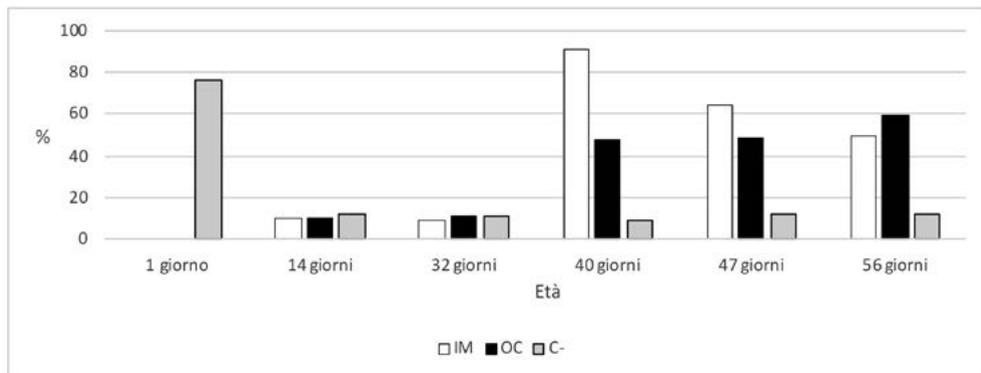
Le PCR per RA eseguite in pool da sacchi aerei e articolazioni nel corso dell'esame autoptico hanno dato esito positivo solo nel gruppo infettato per via oculo-congiuntivale.

I risultati della ricerca di anticorpi prodotti nei confronti di RA sono stati normalizzati rispetto ai controlli ed espressi in percentuale S/P (Figura 1).

Soggetto	Sacco aereo	Polmone	Fegato	Milza	Cervello	Articolazione
1	-	-	-	-	+ (ind)	+
2	+	-	+ (ind)	-	-	+ (ind)
3	+	-	-	-	+	+ (ind)
4	-	-	+ (ind)	+ (ind)	-	+ (ind)
5	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-
8	+	-	+ (ind)	+ (ind)	+	+
9	-	-	+ (ind)	-	-	+ (ind)
10	-	-	-	-	+	-

Tabella 2. Esito degli accertamenti batteriologici eseguiti sul gruppo infettato per via EV (ind= positività ottenuta all'esame batteriologico indiretto).

Figura 1. Media dell'andamento del titolo anticorpale rilevato nei gruppi infettati per via intramuscolare (IM), oculo-congiuntivale (OC) e nel gruppo di controllo (C-).



DISCUSSIONE

I modelli di riproduzione sperimentale della malattia adottati per via OC e IM, non hanno dato origine ai classici sintomi respiratori e neurologici associati alla riemersione del tacchino, ma solo a transitorie forme di zoppia di grado variabile. Questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura per la via OC, ma in contrasto con quanto descritto in un altro studio analogo in cui l'infezione per via IM aveva causato sintomatologia e lesioni anatomico-patologiche gravi (Smith et al., 1987). Si conferma invece la validità nella via endovenosa ai fini di riprodurre un'infezione nella forma clinica classica. Tale rilievo è supportato anche dall'isolamento del microrganismo dagli organi prelevati in sede autoptica, tra i quali spicca la diffusa positività a livello articolare (7/10) che si conferma una localizzazione d'elezione per RA.

Le analisi sierologiche hanno evidenziato una certa reattività nei soggetti all'arrivo che, non essendo frutto di immunizzazione dei genitori, può essere ricondotta solo ad anticorpi materni da infezione, forse sub-clinica, nel corso del ciclo produttivo dei riproduttori. Questa positività decresce velocemente già dopo 2 settimane e rimane bassa sino al momento dell'infezione sperimentale. L'infezione ha comportato un rapido innalzamento del titolo anticorpale già rilevabile dopo 8 gg., mentre il gruppo controllo si è mantenuto su valori bassi pressoché costanti (attorno al 10%) nel corso dell'intera sperimentazione. Si osserva un andamento opposto del titolo anticorpale dei soggetti infettati per via IM rispetto a quelli infettati per via OC. Infatti, nel gruppo IM, dopo un picco iniziale che ha superato il 90%, si assiste ad un suo costante decremento, mentre nel gruppo OC, sebbene la reattività fosse minore del 50% a 8 gg dall'infezione, si osserva un lento ma costante aumento, sino a superare quella del gruppo IM a fine prova. Questo andamento potrebbe essere il frutto della persistenza del microrganismo nelle vie respiratorie superiori dei soggetti infettati per via OC, come evidenziato dai risultati della PCR a 54 gg., che non si è verificato nel gruppo IM. È possibile che, nel gruppo OC, RA sia rimasta nella mucosa congiuntivale o abbia raggiunto le cavità nasali attraverso il dotto lacrimale, e qui sia rimasta senza colonizzare la trachea, se non dopo il 41° giorno di vita.

Il test sierologico sviluppato si è comunque dimostrato adeguato a rilevare anticorpi evocati attraverso entrambe le vie d'infezione inizialmente adottate (IM e OC), ma anche anticorpi verosimilmente di origine materna presenti all'arrivo e calati sensibilmente 20 giorni prima dell'infezione sperimentale. Tale test potrebbe trovare applicazione in futuro per studiare la persistenza di anticorpi nella progenie di gruppi di riproduttori vaccinati per RA, che ad oggi non è noto.

I risultati ottenuti sottolineano quanto la riproduzione clinica della riemerellosi in condizioni sperimentali attraverso vie d'inoculazione naturali, sia imprescindibile da un mix fattori predisponenti, infettivi e non, che solo le condizioni di campo possono garantire.

Il modello sperimentale di riproduzione della malattia messo a punto nel presente studio potrà essere impiegato per studiare l'efficacia di vaccini che consentiranno di ridurre il ricorso alla somministrazione di antimicrobici e contribuire al contrasto al fenomeno dell'antimicrobicoresistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. 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. (2020). Caratterizzazioni genotipiche e fenotipiche di ceppi di *Riemerella anatipestifer* isolati dal pollame in Italia. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria, pp. 45-51.
2. 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, 1612-1619.
3. Crowther, J. R. (2009). The ELISA guidebook (Vol. 566). New York, NY, USA. Humana press.
4. Eugene, C. Y., & Hackett, M. (2000). Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. Analyst, 125(4), 651-656.
5. Giovannetti L. & Pascucci S. (1983). Evoluzione dell'infezione da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino e nel pollo da carne. La Clinica Veterinaria, 106, 42-44.
6. Pascucci S., Pacchioni G., Tagliabue S., & Giovanetti L. (1981). Infezioni da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino. La Clinica Veterinaria, 104, 10-11, 352-354.
7. Riemer O. (1904). Short communication about an exudative septicaemia observed in geese and its causative agent. Zentralblatt Bakteriologie, 37: 641-648.
8. Smith, J. M., Frame, D. D., Cooper, G., Bickford, A. A., Ghazikhanian, G. Y., & Kelly, B. J. (1987). *Pasteurella anatipestifer* infection in commercial meat-type turkeys in California. Avian Diseases, 913-917.

VALUTAZIONE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DI CAMPO E VACCINALI TRAMITE METODICA MULTI LOCUS VARIABLE NUMBER OF TANDEM REPEATS ANALYSIS (MLVA): RISULTATI PRELIMINARI

Stefani E., Matucci A., Gastaldelli M., Cristovao Borges L., Righetti V., Vianello S., Tondo A., Catania S.

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

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) can cause important economic losses in poultry industry. MS infection can be transmitted vertically from breeders to offspring or horizontally among animals from the same farm or from different ones. MS causes synovitis and respiratory diseases mainly in chickens and turkeys. In chicken layers, MS is associated to EAA (Eggshell Apex Abnormality). Strengthening of biosecurity policies, antibiotic treatment and vaccination are the main control strategies applied in the poultry industry. In Italy, two vaccine strains are licensed: MS1 (Nobilis MS live, MSD Animal Health Inc.) and MS-H (Vaxsafe MSH; Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia) this latter is the most used in industry. Discrimination between vaccine and field strains is crucial in the MS vaccination programs. In the last few years, different molecular typing techniques have been developed to address this issue. The sequence analysis of the conserved tract of the variable lipoprotein and hemagglutinating A (*vlhA*) gene (GTS *vlhA*) is one of the most applied typing methods although in some geographical areas it was shown not to be able to correctly discriminate vaccine from field strains. Other molecular methods were described, but they are all based on sequence analysis. Recently, a MLVA (Multi- Locus Variable Number of tandem repeats) protocol was published. This method showed a good discriminatory power, and it is more economic and rapid than sequence-based typing methods. We then decided to investigate its discriminatory power in particular to distinguish vaccine from field MS strains. In this study, we analyzed 117 field strains collected from 2012 and 2021 and 45 MS-H-like strains isolated from vaccinated chickens. Respect to the previously published protocol, our approach consisted in the analysis of 6 tandem repeats *loci* (6 *loci*-MLVA). The 117 field strains were clustered into 19 GTs (genotypes) while the 45 MS-H-like strains were all described as GT3, the same genotype of the reference MS-H vaccine strain. No field strains were co-clustered with the vaccine-like ones. Differently, GTS-*vlhA* grouped the field strains into 14 different types, and MS-H like strains into a unique type (C3-13). However, it classified as C3-13 one known field strain isolate. In conclusion, our preliminary data showed that the 6 *loci*-MLVA is an economic diagnostic tool that may rapidly distinguish MS-H-like from field strains.

INTRODUZIONE

Mycoplasma synoviae (MS) è un microrganismo considerato patogeno e che può provocare ingenti 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 sinoviti e forme respiratorie principalmente in polli e tacchini, nelle galline ovaiole è correlato al calo di deposizione e del peso medio delle uova e può anche dare origine all'anormalità dell'apice dell'uovo (EAA) con conseguenti perdite economiche (1). Per contenere l'impatto negativo di MS e della sua diffusione, vengono applicate negli allevamenti strategie di potenziamento della biosicurezza, mentre in caso di positività eventuali trattamenti antibiotici possono contribuire a mitigare l'impatto dell'infezione sulle performance. Nella specie pollo, per ridurre sia l'infezione che la trasmissione possono essere applicati piani vaccinali con ceppi vivi e attenuati. In Italia, attualmente risultano essere autorizzati due differenti vaccini commerciali, il vaccino MS1 (Nobilis MS live, MSD Animal Health Inc.) ed il vaccino MS-H (Vaxsafe MSH; Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia). Quest'ultimo risulta essere quello maggiormente utilizzato nel settore avicolo italiano (galline ovaiole o polli riproduttori). Distinguere routinariamente tra ceppo vaccinale e ceppi di campo diventa quindi fondamentale nei programmi di controllo diagnostico. Nel corso degli ultimi anni, differenti metodiche molecolari sono state messe a punto a tale scopo. 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 è utilizzato per distinguere i ceppi vaccinali da quelli di campo, ma, è stato più volte dimostrato (4-5), che in alcune aree geografiche non sempre è in grado di discriminare i ceppi in maniera corretta a causa della presenza di ceppi selvatici che presentano lo stesso tipo del ceppo vaccinale. Per MS sono state pubblicate anche altre metodiche molecolari come MLST (Multi-Locus Sequence Typing) (6, 7), basate sull'amplificazione e sequenziamento di diversi geni *housekeeping* che risultano avere un alto potere discriminatorio, ma i tempi di analisi ed i costi associati, possono rappresentare un limite per la loro applicazione in sistemi routinari di screening. Recentemente è stata pubblicata una metodica molecolare MLVA (Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis) (5) che oltre ad avere un buon potere discriminatorio nel differenziare i ceppi di MS si è rivelata utile per la discriminazione tra ceppi vaccinali e ceppi di campo. Il metodo MLVA si basa sull'amplificazione di determinati *loci* di DNA contenenti un numero caratteristico di *tandem repeats* (TR). Dalla dimensione finale dell'amplificato si deduce il numero di TR nel *locus* amplificato. La combinazione del numero di TR presenti in ogni *locus* di ogni campione analizzato definisce lo specifico profilo genotipico GT. Questa metodica, grazie anche all'impiego di strumentazioni di elettroforesi capillare che rendono la valutazione del numero di TR presenti nei *loci* sempre più precisa e rapida, risulta essere più economica e rapida delle precedenti e quindi un ulteriore strumento laboratoristico per il controllo e verifica dei gruppi vaccinati. Nel presente lavoro viene valutato l'impiego di un protocollo MS-MLVA parzialmente modificato per discriminare ceppi di MS isolati da gruppi di animali provenienti da allevamenti vaccinati e non.

MATERIALI E METODI

Selezione dei campioni

Sono stati selezionati 117 ceppi di MS di campo provenienti da allevamenti non

vaccinati pervenuti tra il 2012 e il 2021 nei nostri laboratori e 45 ceppi di MS “reisolati” da allevamenti di pollo vaccinati pervenuti tra il 2015 e il 2017.

Come ceppi di riferimento sono stati utilizzati i ceppi vaccinali MS-H (Vaxsafe MSH), MS1(Nobilis® MS Live) e il ceppo WVU1853 (Tabella 1). Le specie avicole incluse nel lavoro sono: pollo, tacchino e un fenicottero (ceppi di campo) (Tabella 2), pollo per i ceppi vaccinali. I ceppi di campo provengono soprattutto dall'Italia (Tabella 2).

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.

MLVA

La genotipizzazione dei ceppi di MS è stata eseguita seguendo il protocollo a pannello modificato di Kreizinger et. al., 2018 (MLVA a 6 *loci*) (5). I *loci* MS319 e MS578 identificati nel protocollo originale non sono stati inclusi, mentre MS547, MS834 e MS837 sono stati amplificati con set di primer modificati nel *reverse* (Tabella 3). È stato inoltre identificato, usando “Tandem Repeats Finder program” (Benson 1999), ed inserito un ulteriore *locus* (MS531). L'amplificazione dei vari *loci* è stata eseguita con il kit Promega Go Taq Polymerase in un volume di 20 μ l utilizzando 5 μ l di 5x Buffer, 2,5 μ l of MgCl₂, 1 μ l di dNTPs 10 mM, 0.2 μ l di Taq Polymerase e 1 μ l di ogni primer (10 mM). Il ciclo di amplificazione utilizzato prevedeva uno *step* a 95°C per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 30 sec, 56°C per 30 sec e 72°C per 45 sec. L'elongazione finale è di 72°C per 5 min. Per il *locus* MS531 la temperatura di annealing è di 58°C. La lunghezza degli ampliconi è stata valutata con l'elettroforesi capillare Qiaexcel Advanced Systems (Qiagen) utilizzando il kit Qiaexcel DNA Resolution kit e il metodo OM800 secondo le istruzioni suggerite dalla ditta. Il marker di lunghezza e di allineamento utilizzati sono stati il QX size marker 50-800 bp e il QX alignment marker 15 bp/1kb (Qiagen). Per ogni *locus* di ciascun ceppo è stato assegnato un numero corrispondente al numero di TR presenti, dedotto dalle dimensioni dell'amplificato e confermato dal sequenziamento. Alla stringa numerica che ne deriva è stato assegnato un GT (genotyping) numerico (Tabella 4).

*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). La reazione di PCR è stata eseguita 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'. Ad ogni ceppo analizzato mediante analisi GTS-*vlhA* è stato assegnato un “tipo” rappresentato da una lettera dell'alfabeto corrispondente al numero di amminoacidi che compongono la regione ricca in proline (PRR) e la regione in 3' come precedentemente descritto (2, 3, 8 e 9).

Sequenziamento

Il sequenziamento degli amplificati di interesse è stato effettuato 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 (10).

RISULTATI

Sono stati sottoposti a tipizzazione 45 campioni di “reisolati” MS derivanti da allevamenti noti per essere stati vaccinati con ceppo MS-H ed ulteriori 117 ceppi di MS provenienti da allevamenti non vaccinati (campioni di campo) (Tabella 2). pervenuti nei nostri laboratori tra il 2012 e il 2021. Sono state impiegate due metodiche molecolari, GTS-*vlha* già descritta (2-3) e una nuova metodica MLVA a 6 *loci*. I campioni di campo analizzati provengono per la maggior parte da allevamenti italiani e comprendono specie e categorie produttive differenti (Tabella 2).

Il protocollo MLVA prevede l’amplificazione di 6 regioni contenenti dei putativi TR (Tabella 3) e la valutazione del numero di TR dedotto dalle dimensioni ottenute dall’amplificazione nei vari *loci* con elettroforesi capillare è stato confermato anche tramite sequenziamento. Le combinazioni (GT) ottenute dal conteggio dei TR presenti nei vari *loci* può essere apprezzato in Tabella 4. GT1, GT2 e GT3 sono stati associati ai genotipi di WVU1853, MS1 e MS-H rispettivamente (Tabella 1), ed utilizzati come riferimenti. Tutti i campioni “reisolati” vaccinali MS-H sono risultati tipo C3-13 con metodica GTS-*vlha* e GT3 con metodica MLVA a 6 *loci* come atteso (Figura1). I campioni di campo di MS vengono suddivisi in 14 tipi in base alla metodica GTS-*vlha*, e in 19 GT in base alla metodica MLVA (Figura 1). I GT numericamente più rappresentati della maggior parte dei ceppi di campo analizzati sono GT4 (28 ceppi, 23.7%) e GT6 (26 ceppi, 22%) (Figura 1). Gli altri GT risultano numericamente meno rappresentati. Come si può notare in Figura 1, e come già riportato anche per la metodica MLST (9), in un medesimo GT si possono trovare differenti GTS e viceversa. Il GT6, uno dei genotipi numericamente più rappresentato, viene suddiviso in ben 8 tipi dalla metodica GTS-*vlha*, mentre il GT4 è popolato solo da ceppi D ed F. In Figura 1, è interessante anche notare come nessuno dei ceppi di campo analizzati risulta invece GT2 o GT3, genotipi associati ai ceppi vaccinali autorizzati nel territorio italiano (Tabella 1). Il ceppo MS isolato da Fenicottero risulta secondo la tipizzazione GTS-*vlha* appartenere al tipo C3-13 (sequenza del gene *vlha* omologa al ceppo MS-H) mentre con la metodica MLVA a 6 *loci* viene classificato con genotipo GT8.

Tabella 1: Ceppi MS utilizzati come riferimento del presente lavoro e loro relative tipizzazioni.

Sample ID	Tipo (<i>vlhA</i>)	GT (MLVA)
WVU1853	A	1
MS1	A	2
MS-H	C3-13	3

Tabella 2: Anno, provenienza e categoria produttiva dei ceppi MS di campo analizzati

ANNO	ITALIA			GIORDANIA	LIBANO	SPAGNA	TAIWAN	TUNISIA	TOTALE
	Pollo	Fenicottero	Tacchino	Pollo	Pollo	Pollo	Pollo	Pollo	ANNO
2012	6		1					2	9
2013	7		5	2	2		1		17
2014	10	1	5						16
2015	14		2			1			17
2016	9		3			3			15
2017	6		2						8
2018	4		2						6
2019	5								5
2020	7		5						12
2021	12								12
TOTALE	80	1	25	2	2	4	1	2	117

Tabella 3: Sequenza dei primer e caratteristiche dei *loci* del protocollo MLVA a 6 geni.

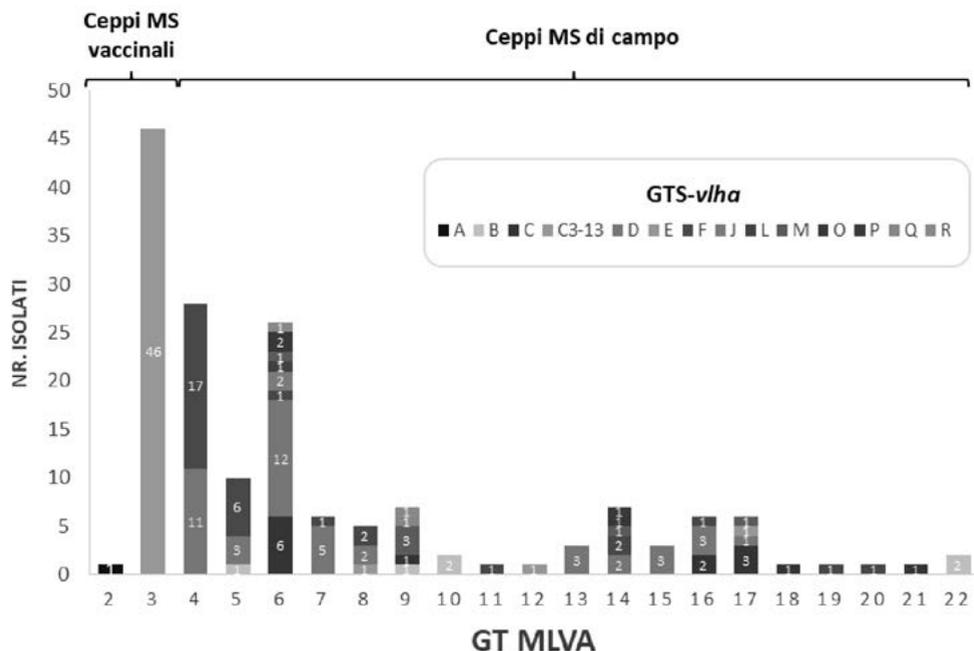
Locus	Posizione nel genoma (bp)	Lunghezza TR (bp)	Sequenza del TR	Lunghezza amplificato (bp)	Sequenza primer
MS233	223491-223538	9	AAAATACCR	150-160	<i>MS233tr6-F*</i> TTAGACTACTACGATCTAAAAGCCTTG <i>MS233tr6-R*</i> CCTGGTGCAACTGCAGATGC
MS531	531545-532059	15	TTTTGATCTAAAAA	500-530	<i>MS531tr16-F</i> TATCAAAAATTCTAATGAAAATGTGAAA <i>MS531tr16-R</i> TGATAYGAAGGAATTATGAATGRCC
MS547	547242-547576	12	GAYGAAGAAGAA	150-160	<i>MS547tr17-F*</i> GATTATTAGATGAAGACGATT <i>MS547tr17-R</i> CCGATTCAACGCATGTATCATT
MS682	681627-681638	12	TCTGATTTTCT	320-370	<i>MS682tr21-F</i> GATCTAGTTGATTGATAAACTTGAAGG <i>MS682tr21-R</i> GCTTCAACAACCTTAAAGCTGATGC
MS834	833877-833917	21	TTATGTTTAT- CAATTCATT	221	<i>MS834tr23-F*</i> GGCAATTC AAGGATTTATTGAGCA <i>MS834tr23R</i> AAGAAGCGATACTTAGATCAGGACAC
MS837	837499-837529	15	TTTATATTACATT	242	<i>MS837tr24-F*</i> GCACTTATATTTCTGTGATAGTTG <i>MS837tr24-R</i> AGCAATCCGCAAATGTTGC

* Kreizinger et. al., 2018 (5)

Tabella 3: Numero di TR per ogni locus e corrispondente GT. (0 = no amplificazione)

GT	MS223	MS531	MS547	MS682	MS834	MS837
1	2	2	2	2	1	0
2	2	2	2	2	1	1
3	1	1	2	3	1	1
4	2	1	2	1	0	0
5	2	0	2	1	0	0
6	2	0	2	1	1	1
7	2	0	2	1	0	1
8	2	1	2	1	0	1
9	2	0	0	1	0	0
10	2	1	2	2	1	0
11	2	0	2	2	0	0
12	2	0	2	3	0	0
13	1	1	2	1	1	1
14	2	1	2	1	1	1
15	1	1	2	1	0	0
16	2	0	0	1	0	1
17	2	0	0	1	1	1
18	2	0	2	4	1	1
19	2	0	1	1	1	1
20	2	0	1	1	1	0
21	1	0	2	1	0	0
22	2	3	2	3	0	1

Figura 1: Distribuzione del numero di ceppi MS in base alla tipizzazione ottenuta con metodica MLVA a 6 loci e GTS-*vlha*, il numero interno alla barra indica il numero di ceppi. Sono stati inclusi anche i ceppi di riferimento MS-H (GT3) e MS1 (GT2).



DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo impiegato una nuova metodica MLVA a 6 loci su 117 ceppi di MS provenienti da allevamenti non vaccinati pervenuti nei nostri laboratori tra il 2012 e il 2021 e su 45 ceppi di MS “reisolati” da allevamenti vaccinati pervenuti tra il 2015 e il 2017, con l’obiettivo di dimostrare la capacità discriminatoria della metodica MLVA nei confronti dei differenti isolati, ma anche tra questi ultimi ed i ceppi vaccinali utilizzabili nel territorio italiano. Il protocollo MLVA da noi implementato deriva da quello pubblicato da Kreizinger et. al., 2018 (5) ma modificato in alcuni loci e primer di amplificazione. La metodica MLVA, a differenza delle comuni metodiche di tipizzazione (MLST e GTS-*vlha*), si basa sulla valutazione della dimensione degli amplificati e nella routine, non prevede una fase di sequenziamento consentendo quindi una più rapida processazione ed analisi del campione. La refertazione del campione può essere eseguita in giornata rendendo il metodo utile come sistema di controllo su gruppi di animali vaccinati. Questo protocollo MLVA ha un potere discriminatorio simile alla metodica GTS-*vlha* suddividendo i ceppi di MS di campo analizzati in 19 GT contro i 14 tipi GTS-*vlha*. I GT maggiormente rappresentati dai ceppi di MS da noi analizzati sono il GT4 e il GT6. La distribuzione dei GT ottenuti con il protocollo MLVA a 6 loci rispetto al GTS-*vlha* ci fa notare come uno stesso GT possa essere diviso in più tipi

e viceversa. Questa osservazione è già stata riscontrata anche in altri lavori (4 e 9) e suggerisce che l'analisi epidemiologica ed una genotipizzazione dovrebbero sempre preferibilmente essere associate all'utilizzo di più metodiche per meglio classificare un ceppo. Tra i ceppi di campo analizzati abbiamo inserito il ceppo di fenicottero già discusso in Catania et al, 2016 (4). Questo ceppo di MS, isolato da un fenicottero presente in un parco zoologico locale e non vaccinato, è risultato dopo analisi GTS-*vlha* possedere lo stesso tipo C3-13 del ceppo vaccinale MS-H. Già in altri lavori (4 e 5) è stato evidenziato che la tipizzazione GTS-*vlha* non sempre riesce a discriminare i ceppi di MS di campo da quelli vaccinali. La metodica MLVA a 6 loci assegna a questo ceppo il genotipo GT8, differente dal GT3 che è invece associato al MS-H ed ai suoi "resiolati". Questo risultato conferma quello ottenuto con l'analisi MLST (9) che attribuiva al campione MS di fenicottero l'ST131, differente dall'ST vaccinale (ST43) classificandolo dunque, come già proposto in precedenza, ceppo di campo.

Allo stesso tempo la metodica tipizza correttamente i 45 ceppi di MS "reisolati" da allevamenti vaccinati assegnando loro il genotipo GT3, lo stesso genotipo appartenente al ceppo vaccinale MS-H. Su tali basi il metodo risulta essere un ottimo candidato per le attività di monitoraggio e screening dei gruppi avicoli vaccinati finalizzato ad individuare l'effettiva presenza del ceppo vaccinale, ma nel contempo evidenziare eventuali infezioni di campo. Per quanto riguarda il ceppo vaccinale MS live abbiamo un'ottima discriminazione sul ceppo di riferimento, mentre occorrerà avere una maggiore casistica sui gruppi vaccinati con tale ceppo che purtroppo attualmente non abbiamo.

CONCLUSIONE

I nostri risultati suggeriscono che il protocollo MLVA a 6 loci è una metodica rapida, economica che permette la chiara discriminazione tra ceppi vaccinali e ceppi di campo. Tale metodica in particolare riesce a coniugare le necessità di rapidità ed efficacia per gli screening di valutazione di effettiva vaccinazione ed eventuale infezione con ceppi di campo, superando i limiti della metodica GTS-*vlhA* (false attribuzioni a ceppi vaccinali) ed evitando passaggi di sequenziamento tipici della metodica MLST. Ulteriori indagini di approfondimento per una completa validazione sono in corso.

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. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Moronato ML, Cecchinato M, Facchetti G, Mainenti M, Gobbo F, Catania S. Application of different laboratory techniques to monitor the behaviour of a *Mycoplasma synoviae* vaccine (MS-H) in broiler breeders. *BMC Vet Res*. 2018 Nov 20;14(1):357
9. Stefani E., Matucci A., Tondo A., De Grandi G., dal Pra M., Gastaldelli M., Catania S. Tipizzazione molecolare di isolate italiani di *Mycoplasma Synoviae*: risultati preliminari. *Atti della società di Patologia Aviare 2020: LIX Convegno Annuale e V Simposio Scientifico*. 193-204.
10. Hall, Tom A. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucleic acids symposium series*. Vol. 41. No. 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999.

VALUTAZIONE DI UN METODO DIAGNOSTICO PREDITTIVO DELLA SPONDILITE ENTEROCOCCICA IN GRUPPI DI BROILER COMMERCIALI

Cordioli B., Bacchin C., Palazzolo L., Rizzardi A., Montagner A., Zarpellon G., Bottin S., Guolo A., Drigo I., Bano L.

Sezione Diagnostica di Treviso, IZS delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba, Treviso.

Summary

The genus *Enterococcus* includes avian pathogenic species, like *Enterococcus (E.) cecorum*, the causative agent of enterococcal spondylitis in broilers. The symptomatic picture of spondylitis is called “kinky back” and it is associated with osteochondrosis of the free thoracic vertebra (T6). Some authors speculate that the disease is directly related to the degree of the intestinal colonization observed in the first week of life. In the present field study we quantified the intestinal load of *E. cecorum* in 21 broiler flocks through a quantitative Real-Time PCR protocol in 1 to 4 day old chicks. Every flock was monitored until slaughtered and in seven groups enterococcal spondylitis was diagnosed. Based on the molecular results, 1.84×10^8 CFU/g of *E. cecorum* can be considered the predictive value for spondylitis in broiler chickens.

INTRODUZIONE

Il genere *Enterococcus (E.)* identifica cocci Gram-positivi disposti in catene per un totale di 36 specie batteriche (Fisher & Phillips, 2009). In patologia aviaria gli enterococchi possono provocare diverse forme cliniche: onfaliti, endocarditi, encefaliti e patologie articolari (*E. faecalis* in ovaiole e riproduttori ed *E. cecorum* in broiler) a trasmissione diretta e indiretta. I soggetti possono infettarsi in seguito alla contaminazione dell'uovo con materiale fecale, ma anche per via inalatoria, orale, transcutanea o iatrogena (es: lotti vaccinali contaminati da *E. faecalis*) (Pattison et al., 2007). *E. cecorum* è un patogeno anaerobio facoltativo, catalasi e ossidasi negativo, che predilige atmosfere con 5% di CO₂ e terreni solidi addizionati col 5% di globuli rossi di pecora incubati preferibilmente a 35 °C. Studi recenti hanno dimostrato che la sua persistenza nell'ambiente è inversamente proporzionale alla temperatura e all'umidità (Grund et al., 2020). Il microrganismo è responsabile di osteonecrosi e spondilite nel broiler, patologia emergente e cosmopolita comparsa in Italia nel 2009, che coinvolge preferibilmente soggetti maschi a partire da 28 giorni di vita e riproduttori di 6-8 settimane, con mortalità e morbilità che possono raggiungere rispettivamente il 35% e il 15% (Bano et al., 2010; Jung et al., 2018).

Il quadro sintomatologico associato alla spondilite prende il nome di “kinky back”: atteggiamento dovuto al danno spinale che costringe il soggetto a poggiare sui tarsi o sul coccige con gli arti inferiori estesi cranialmente. Le lesioni caratteristiche sono delle osteonecrosi o osteomieliti in cui il tessuto osseo è danneggiato e progressivamente sostituito da materiale necrotico-eterofilico osservabile a livello di corpo vertebrale o di epifisi femorale prossimale. Le lesioni a carico del rachide si localizzano principalmente a livello della sesta vertebra toracica (T6), unica vertebra mobile

della colonna vertebrale del pollo, e talvolta anche di T7 (Wideman, 2016; Palazzolo et al., 2021).

Le sollecitazioni meccaniche a carico dall'apparato scheletrico di soggetti a rapido accrescimento, come gli ibridi commerciali, si concentrano sulla vertebra T6 comportando microfratture ossee simili a quelle che si osservano nelle ossa lunghe in caso di osteocondrosi dissecante (ODC), che può essere seguita da osteonecrosi batterica con osteomielite (BCO) (Wideman, 2016). Infatti, in casi di setticemie da *E. cecorum*, le microemorragie intraossee favoriscono l'invasione di tale tessuto da parte dei batteri circolanti e un loro successivo sequestro all'interno di tessuto osseo immaturo, in cui esercitano attività litica, e la conseguente spondilite. Il procedere del processo litico porta alla formazione di un nucleo di materiale osteo-necrotico-eterofilico che può fistolizzare sia verso la cavità celomatica, dove viene racchiuso da una capsula fibrosa che circonda classicamente la lesione, sia verso il canale vertebrale dove può causare compressioni del midollo spinale in seguito al cedimento del tessuto vertebrale patologico. Le lesioni e la sintomatologia (kinky back) che si osservano in caso di spondilite sono solo le manifestazioni più evidenti di setticemie precoci da *E. cecorum*. Infatti, non è infrequente l'isolamento del microrganismo da organi parenchimosi o da segmenti ossei di pulcini di pochi giorni.

La spondilite da *E. cecorum* risulterebbe correlata direttamente al grado di colonizzazione intestinale osservato nella prima settimana di vita (anche nel primo giorno), come hanno dimostrato 2 studi longitudinali di tipo caso-controllo, condotti con due metodiche diverse: una di batteriologia classica e l'altra su base bio-molecolare (Borst et al., 2017; Jung et al., 2017). Quest'ultima, sebbene sia una tecnica potenzialmente quantitativa, nello studio citato non veniva correlata a una carica intestinale di *E. cecorum*, ma solo a valore CT.

L'obiettivo dello studio è quantificare la presenza di *E. cecorum* in ambito intestinale in broiler di pochi giorni e definire il limite considerabile predittivo per la successiva comparsa di spondilite enterococcica.

MATERIALI E METODI

Sviluppo della metodica diagnostica

A partire da una sospensione di *E. cecorum* (ceppo di riferimento DSM20682) e soluzione fisiologica di torbidità 0,6 McFarland sono state eseguite 10 diluizioni in base dieci. In ogni diluizione è stata quantificata la carica di *E. cecorum* attraverso la semina per spatolamento di 100 µL di sospensione in tre piastre di terreno solido addizionato col 5% di globuli rossi di montone incubate per 24h in condizioni di microaerofilia (5%CO₂).

Le diluizioni che presentavano crescita di *E. cecorum* quantificabile (0-250 colonie) sono state sottoposte, in doppio, a estrazione del DNA batterico con kit MagMax Total (Termofisher) e a Real-Time PCR secondo il protocollo descritto da Jung et al. (2017). Le medie dei valori ottenuti dalle conte microbiologiche e dai valori CT della metodica bio-molecolare sono state rielaborate mediante il software GraphPad Prism 5.0 per ottenere la curva di taratura.

Studio in campo

Lo studio ha riguardato 21 gruppi di broiler commerciali. All'inizio del ciclo pro-

duttivo (1-4 gg), da 3 a 8 soggetti di ciascun gruppo venivano conferiti alla Sezione Diagnostica di Treviso dell'IZS delle Venezie per controlli diagnostici routinari a inizio ciclo.

Da ogni gruppo è stato raccolto un pool di contenuto intestinale prelevato in corrispondenza di ileo terminale, cieco e colon terminale, da sottoporre a Real-Time PCR secondo il protocollo descritto da Jung et al. (2017) e convertite in Unità Formanti Colonia/grammo (UFC/g) secondo la curva di taratura ottenuta nello sviluppo della metodica diagnostica.

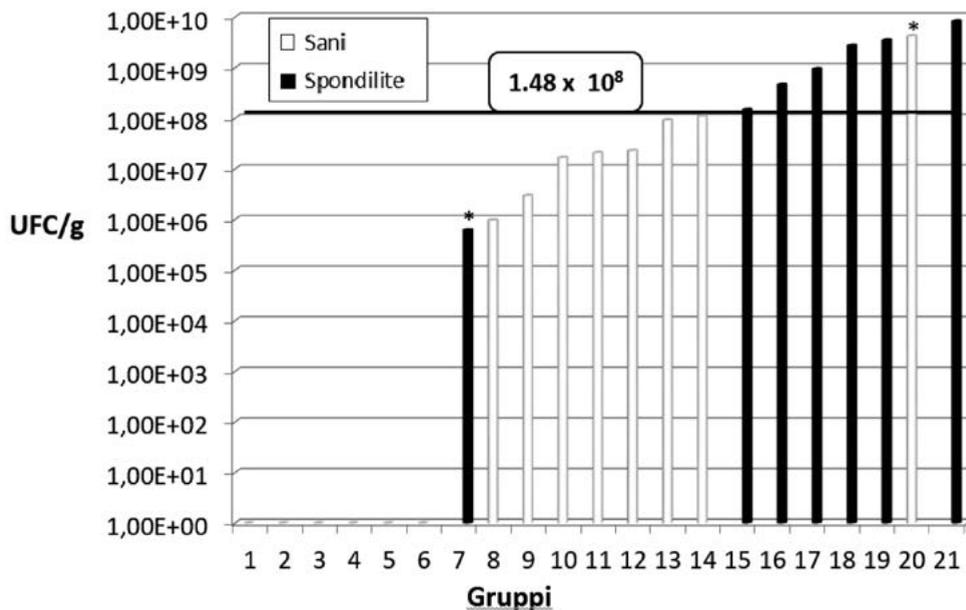
Tutti i gruppi sono stati monitorati clinicamente durante l'intero ciclo produttivo al fine di valutare la comparsa di sintomi riferibili a spondilite. Alcuni soggetti sintomatici sono stati sottoposti ad esame necroscopico in campo per la verifica di lesioni vertebrali ascrivibili a spondilite enterococcica.

RISULTATI

Quattordici gruppi (1-6, 8-14 e 20) non hanno presentato sintomatologia riferibile a spondilite enterococcica. Ad eccezione del gruppo 7, tutti i gruppi che hanno manifestato la patologia presentavano una carica intestinale di *E. cecorum* superiore a $1,48 \times 10^8$ UFC/g a inizio ciclo. Solo un gruppo (20), pur presentando una carica intestinale maggiore rispetto al valore soglia, non ha manifestato la malattia.

I risultati quantitativi di ciascun gruppo di broiler incluso nello studio, vengono riportati in figura 1.

Figura 1 Quantificazione degli enterococchi espressa in UFC/g impiegando una scala logaritmica (ordinate).



DISCUSSIONE

I nostri risultati confermano la relazione esistente tra carica intestinale di *E. cecorum* nei primi giorni di vita e comparsa di spondilite enterococcica, come riportato in letteratura (Borst et al., 2017, Jung et al., 2017). Tuttavia tali studi si sono basati su osservazioni raccolte in numeri esigui di gruppi di broiler, in particolare quello di Jung et al. (2017) che ha messo a confronto la carica intestinale di *E. cecorum* tra solo due gruppi. Il presente studio propone come cut-off predittivo per la spondilite enterococcica, un valore di 1.48×10^8 UFC/g, rilevato nei primi 4 giorni di vita. Infatti sulla base delle quantificazioni intestinali di *E. cecorum* nei gruppi considerati, tale limite conferisce buone sensibilità e specificità alla metodica bio-molecolare nel rilevare i gruppi che manifesteranno la malattia. Solo in due gruppi (7 e 20) la quantificazione di *E. cecorum* in ambito intestinale non è risultata predittiva della spondilite. Per il gruppo 20 tale fenomeno potrebbe essere la conseguenza di eventuali trattamenti antimicrobici somministrati durante il ciclo produttivo per altre patologie e che potrebbero avere influenzato la microflora intestinale, inclusa la componente enterococcica. Il gruppo 7 è stato l'unico che, pur manifestando la malattia nel corso del ciclo produttivo, aveva una carica intestinale inferiore al cut-off proposto. La spiegazione potrebbe essere ricondotta alla presenza di fattori predisponenti la spondilite (es. qualità della lettiera) o a limiti legati alla numerosità del campione e/o alla variabilità degli individui selezionati.

CONCLUSIONI

Il presente studio conferma come esista una correlazione tra carica intestinale di *E. cecorum* all'inizio del ciclo produttivo e la comparsa di spondilite e suggerisce un protocollo diagnostico predittivo utile all'indagine di fattori predisponenti o concomitanti della malattia, a favore di un uso razionale dell'antimicrobico. Il metodo si presta inoltre a studiare tutti i fattori nutrizionali che possono concorrere a mantenere bassa la carica di *E. cecorum* durante il ciclo produttivo (prebiotici, probiotici e oli essenziali ecc.).

BIBLIOGRAFIA

1. Arne Jung, Laura R. Chen, M. Mitsu Suyemoto, H. John Barnes, & Luke B. Borst (2018). A Review of Enterococcus cecorum Infection in Poultry. Avian Dis (2018) 62 (3): 261–271.
2. Bano, L., Bonci, M., Drigo, I., Ferro, T., Vascellari, M., Cesca, A., & Agnoletti F. (2010). Spondilite da Enterococcus cecorum nel pollo da carne. 49° Convegno Della Società Italiana Di Patologia Aviaria (SIPA), Forlì. 81-85.
3. Borst, L. B., Suyemoto, M. M., Sarsour, A. H., Harris, M. C., Martin, M. P., Strickland, J. D., & Barnes, H. J. (2017). Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by Enterococcus cecorum in broiler chickens. Veterinary pathology, 54(1), 61-73.
4. Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology, 155(6), 1749-1757.
5. Grund, A., Rautenschlein, S., & Jung, A. (2021). Tenacity of Enterococcus cecorum at different environmental conditions. Journal of applied microbiology, 130(5), 1494-1507.

6. Jung, A., Petersen, H., Teske, L., & Rautenschlein S. (2017) Colonization patterns of *Enterococcus cecorum* in two different broiler production cycles detected with a newly developed quantitative real-time PCR. *BMC Microbiol* 17, 106 (2017).
7. Palazzolo L., Cordioli B., Cornaggia M., Viel L., Drigo I., & Bano L. (2021). Aggiornamenti sul ruolo degli enterococchi nelle infezioni dell'apparato scheletrico del pollo da carne. 60° Convegno della Società Italiana Di Patologia Aviaria (SIPA), Rimini (RN) 7 Settembre 2021
8. Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M., & Alexander, D. (Eds.). (2007). *Poultry diseases*. Elsevier Health Sciences.
9. Wideman Jr., R. F. (2016). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. *Poultry science*, 95(2), 325-344.

RUOLO DI *MUSCA DOMESTICA* COME VETTORE IN UN EPISODIO DI BOTULISMO OSSERVATO IN ALLEVAMENTO COMMERCIALE DI QUAGLIE (*COTURNIX COTURNIX*)

Palazzolo L.¹, Camarda A.², Cordioli B.¹, Cornaggia M.¹, Di Castri A.¹, Drigo I.¹, Rizzardi A.¹, Zarpellon G.¹, Streparola G.³, Viel L.¹, Bano L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE), Vicolo Mazzini 4, 31020, Fontane di Villorba, Treviso;*

²*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, S.P. Casamassima km. 3, 70010 Valenzano, Bari;*

³*Agricola Italiana Alimentare (AIA) S.p.A., Via Valpantena, 18/G, 37142 Quinto di Valpantena, Verona.*

Summary

The present report describes an uncommon avian botulism outbreak caused by BoNT type D/C occurred in a commercial quail flock (*Coturnix coturnix*). The episode occurred in July 2020 in a farm of 40.000 quails. The birds showed neuro-paralytic signs and a mortality rate which reached 30%. No gross lesions were observed and the routine diagnostic examinations for viruses and bacteria resulted negative.

The epidemiological investigation reveals an anomalous high number of flies outside and inside the farm. Some death flies were observed in the drinking cups of symptomatic birds. Drinking water was collected from the central cistern, peripheral tank of the rooms and from the drinking cups in the cages that hosted affected quails. An insecticide was dispersed outside the farm and died flies were collected for BoNT-encoding genes research.

The results from environmental samples revealed the presence of BoNT type D/C in the drinking water collected from the cups and in the flies. Our findings sustain the possible role of the flies (*Musca domestica*) as mechanical vectors for botulism in poultry.

INTRODUZIONE

Il botulismo aviare è una malattia neuro-paralitica che colpisce un ampio numero di specie di uccelli domestici e selvatici. I segni clinici sono caratterizzati da abbattimento, decubito tarsale, riluttanza al movimento, ptosi delle ali e delle palpebre e incapacità di sollevare il capo che, per questo motivo, viene appoggiato sul piano ("limber neck"). Tali sintomi sono dovuti a una paralisi flaccida caudo-craniale che coinvolge i muscoli di arti inferiori, ali, collo e palpebre culminando con la morte dell'animale in seguito ad insufficienza respiratoria dovuta alla paralisi della componente muscolare deputata a tale funzione (Dohms et al., 1982; Blandford & Roberts, 1970; Peck et al., 2017).

L'agente eziologico del botulismo è una neurotossina (BoNT) di cui si riconoscono 7 diversi sierotipi identificati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla H, prodotte da specie appartenenti al genere *Clostridium*: batteri sporigeni Gram positivi anaerobi obbligati (Segner et al., 1971; Oguma et al., 1986). Un tempo si credeva che le BoNTs fossero prodotte da un'unica specie clostridica chiamata *Clostridium botulinum*. Oggi sappiamo che *C. botulinum* è formato da almeno 4 specie diverse che hanno mantenuto

la stessa nomenclatura ma a cui viene assegnato un gruppo diverso identificato con numeri romani (da I a IV). In aggiunta esistono alcuni ceppi di *C. butyricum* e di *C. baratii* in grado di produrre BoNTs rispettivamente di tipo E ed F (Peck et al., 2017). Le BoNTs sono proteine idrosolubili in grado di provocare una sindrome paralitica in molte specie animali e nell'uomo attraverso il clivaggio di un gruppo di proteine definite SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor), coinvolte nel meccanismo del rilascio dell'acetilcolina a livello pre-sinaptico. Il mancato rilascio di acetilcolina ad opera dell'azione enzimatica di BoNT su questo gruppo di proteine, causa la classica paralisi flaccida osservata nei casi di botulismo (Montecucco et al., 1996). Il botulismo umano è sostenuto da BoNT di tipo A, B, E, F mentre quello animale è causato principalmente dai sierotipi C, D e dalle loro forme mosaico D/C e C/D derivanti dal rimodellamento genetico dei fagi che veicolano i geni codificanti le tossine di questi due sierotipi (Anniballi et al 2013; Woudstra et al., 2012). Tali sierotipi derivano da *C. botulinum* gruppo III, oggi chiamato *C. novyi sensu lato*, a cui appartengono anche *C. novyi* e *C. haemolyticum* (Skarin et al., 2011)

In particolare, le BoNTs tipiche del botulismo aviare appartengono ai sierotipi C, C/D, D/C, E, tipica degli uccelli ittiofagi, e raramente A (Bano et al., 2017; Chipault et al. 2015; Circella et al., 2019; Hannett et al., 2011; Souillard et al., 2017; Souillard et al., 2021; Fillo et al., 2021). Il sierotipo più frequentemente implicato in casi di botulismo aviare è il C/D, che risulterebbe più letale rispetto a BoNT C non-mosaico (Takeda et al 2005; Miyazaki & Sakaguchi, 1978; Anza et al., 2014; Bano et al., 2017; Woudstra et al., 2012; Fillo et al., 2021).

La prima segnalazione di BoNT tipo C in insetti raccolti in un focolaio di botulismo aviare è avvenuto in larve di mosca verde (*Lucilia caesar*) che si erano cibate delle carcasse in un allevamento di polli (Bengtson, 1922). In seguito si è visto che le larve di dittero e gli insetti necrofagi giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi e nel mantenimento di diversi focolai di botulismo aviare, spiegando anche come uccelli non necrofagi fossero coinvolti in numerosi casi di intossicazione (Duncan & Jensen, 1976; Foreyt & Abinanti, 1980; Hubalek & Halouzka, 1991; Wobeser, 1997).

Anche dalle mosche, prelevate da luoghi prossimi ai focolai di botulismo sono stati isolati Clostridi produttori di BoNT/C e C/D ma fino al 2014 il ruolo delle mosche in focolai di botulismo aviare non era ancora noto (Duncan & Jensen, 1976; Vidal et al., 2013). Anza et al. (2014) riuscirono a dimostrare sperimentalmente, ricreando le condizioni di un focolaio, che era possibile per le mosche trasportare i Clostridi BoNT-produttori per 24 ore, tempo sufficientemente ad alcuni tipi di mosca per percorrere dai 6 ai 32 km.

Il nostro studio riporta un caso di botulismo aviare in un allevamento di quaglie, la cui genesi è plausibilmente da attribuire al ruolo di vettore meccanico della mosca.

MATERIALI E METODI

Nel luglio del 2020, in un allevamento a ciclo chiuso di circa 40000 quaglie (36000 soggetti da carne e 4000 coppie di riproduttori) della provincia di Verona, si segnalava un aumento della mortalità che in poche settimane interessava il 30% dell'effettivo. Gli animali erano stabulati in gabbie poste in batterie di 5 piani, di cui 2 inutilizzati in modo alternato, che occupavano 5 stanze. Le gabbie erano ben separate tra loro impedendo contatti diretti tra gli animali di gabbie adiacenti. I soggetti erano alimentati con mangime commerciale distribuito attraverso coclea in partenza dal silo esterno e per caduta

alle mangiatoie poste in ciascuna gabbia. L'acqua scorreva dalle cisterne di raccolta alle vaschette intermedie, poste in alto in diversi punti all'interno delle stanze di allevamento, per poi arrivare per gravità separatamente ai vari abbeveratoi delle gabbie.

Gli animali colpiti manifestavano una sindrome paralitica di vario grado caratterizzata da ali cadenti, ptosi palpebrale, decubito tarsale e morte di tutti i soggetti sintomatici. La mortalità colpiva tutti i soggetti di una stessa gabbia, mentre i soggetti ospitati nelle gabbie adiacenti potevano non essere colpiti dalla malattia.

Inizialmente le carcasse dei soggetti deceduti erano state conferite a un laboratorio diagnostico privato che escludeva le più comuni cause virali e batteriche di mortalità della quaglia. Lo stesso laboratorio inviava i pacchetti intestinali presso la Sezione Diagnostica di Treviso dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie che confermava la diagnosi di botulismo aviare sostenuto da BoNTs di tipo D/C attraverso procedure di laboratorio precedentemente descritte (Bano et al., 2017).

In seguito alla positività riscontrata si decideva un sopralluogo aziendale congiunto tra personale veterinario dell'IZS e veterinario aziendale al fine di individuare la fonte della tossinfezione o di intossicazione e per condurre un'indagine epidemiologica completa. Inizialmente sono stati prelevati campioni di alimento ed acqua. Quest'ultima è stata prelevata in più punti: cisterna centrale, vasca di stoccaggio presenti nelle singole stanze di allevamento e abbeveratoi.

I campioni d'acqua sono stati sottoposti alla ricerca di tossina botulinica attraverso prova biologica, come previsto dalla procedura del Centro di Referenza per il Botulismo (CNRB 30.012, 2021). Gli stessi campioni d'acqua, quelli d'alimento e i pool di ditteri raccolti negli abbeveratoi sono stati sottoposti alla ricerca di Clostridi produttori di neurotossine. Per i sierotipi A, B, E ed F è stato applicato il protocollo in real-time PCR del CNRB (31.012, 2021) mentre per i tipi C, D e per le forme mosaico sono stati applicati protocolli di PCR precedentemente pubblicati (Franciosa et al., 1996).

RISULTATI

Il sopralluogo aziendale ha evidenziato la presenza di numerosi ditteri (*Musca domestica*) all'interno e all'esterno delle stanze d'allevamento. Molti di questi erano rinvenuti morti al di fuori delle stanze in seguito a trattamenti periodici con antiparassitari indirizzati ad abbatterne la carica, a base di Thiamethoxam (TMX). All'interno delle stanze erano presenti esemplari vivi e morti, alcuni erano deceduti all'interno degli abbeveratoi. In prossimità dell'allevamento era presente una fossa di stoccaggio delle deiezioni, ritenuto il sito di moltiplicazione delle mosche.

Gli accertamenti di laboratorio per la ricerca di tossina botulinica dall'acqua hanno dato tutti esito negativo. Clostridi produttori di BoNT tipo D/C sono stati invece evidenziati nel pool di ditteri prelevato al di fuori delle stanze e nelle vaschette d'abbeverata, ma solo in quelle dove erano presenti degli esemplari di dittero deceduti e dove le quaglie manifestavano sintomatologia o erano già tutte morte.

Al contrario l'acqua degli abbeveratoi in cui non erano presenti mosche morte era risultata negativa, così come il campione di alimento analizzato.

DISCUSSIONE

Quella aviare è la forma di botulismo più frequente in natura ed è dovuta principalmente al sierotipo mosaico C/D. Nel caso oggetto del presente studio, responsabile dell'episodio di malattia era un sierotipo rinvenuto sporadicamente negli uccelli, che invece

è il più frequente nei casi di botulismo bovino (Fillo et al., 2021). Questo riscontro è molto importante e apre interrogativi interessanti circa l'origine della malattia.

La mortalità a “macchia di leopardo” nelle gabbie della stessa batteria o di batterie diverse nella stessa stanza, porterebbero ad escludere la forma tossinfettiva alimentare, tipica del botulismo umano e di quello bovino. Infatti i risultati sia sull'acqua prelevata prima della distribuzione negli abbeveratoi che sull'alimento hanno dato esito negativo. La positività riscontrata negli abbeveratoi, dove le mosche andavano a morire, e negli esemplari di dittero raccolti all'esterno e all'interno dell'allevamento, fanno ritenere che questi insetti abbiano giocato un ruolo epidemiologico importante nella distribuzione anomala della mortalità osservata in allevamento.

E' da anni noto il ruolo delle larve di dittero che si sviluppano in carcasse di uccelli deceduti per botulismo nel mantenimento della malattia. Queste veicolano infatti sia le spore botuliniche che le neurotossine preformate (Duncan & Jensen, 1976; Foreyt & Abinanti, 1980; Hubalek & Halouzka, 1991; Wobeser, 1997).

Come osservato da Anza et al. (2014) anche i ditteri adulti possono avere un ruolo importante nella diffusione delle spore botuliniche, come probabilmente accaduto nel caso descritto in questa tesi. Si può ipotizzare che le mosche, portatrici di BoNT o di Clostridi BoNT-produttori, stordite dal trattamento insetticida si siano prima disperse tra le gabbie per poi morire nell'acqua degli abbeveratoi. Questo meccanismo spiegherebbe la mortalità a macchia di leopardo delle gabbie. Un effetto tossico da TMX è da escludersi in quanto si tratta di un neonicotinoide selettivo per i recettori degli insetti, mentre vengono segnalati episodi di epatotossicità cronica e carcinogenesi in mammiferi (ratti, topi, conigli).

CONCLUSIONI

La lotta alle mosche deve costituire una parte importante dei programmi di biosicurezza delle aziende avicole. Il controllo delle popolazioni di ditteri, infatti, realizzato attraverso l'applicazione di barriere anti-insetto, di trappole adesive, o di prodotti insetticidi, può rappresentare un metodo efficace di riduzione del rischio di introduzione di patogeni all'interno degli allevamenti. Queste misure non possono prescindere da una corretta gestione delle carcasse che devono prontamente essere allontanate per evitare che sulle stesse le mosche possano deporre le uova.

Nonostante sia stata evidenziata una relazione diretta tra la comparsa del botulismo negli allevamenti avicoli e la presenza delle mosche, molti sono gli aspetti che la ricerca deve ancora chiarire. Tra gli altri, ad esempio non è noto se le mosche rappresentino solo dei vettori meccanici delle spore, se fungano da vettori biologici, o se, al loro interno, il *C. botulinum* possa replicare e quindi essere diffuso, attraverso le loro escrezioni. Questo, al fine di disporre informazioni utili ad implementare piani efficaci di controllo della malattia che in alcune aree a forte vocazione avicola può avere un impatto economico significativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Anniballi, F., Auricchio, B., Woudstra, C., Fach, P., Fiore, A., Skarin, H., Bano L., Segerman, Knutsson R., & De Medici, D. (2013). Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecurity and bioterrorism: biodefense strategy, practice, and science*, 11(s1), S207-S214.

2. Anza, I., Vidal, D., & Mateo, R. (2014). New insight in the epidemiology of avian botulism outbreaks: necrophagous flies as vectors of *Clostridium botulinum* type C/D. *Environmental microbiology reports*, 6(6), 738-743.
3. Bano, L., Drigo, I., Tonon, E., Pascoletti, S., Puiatti, C., Annibaldi, F., Auricchio B., Lista F., Montecucco C., & Agnoletti, F. (2017). Identification and characterization of *Clostridium botulinum* group III field strains by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*, 48, 126-134.
4. Bengtson, I. A. (1922). Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. *Public Health Reports (1896-1970)*, 164-170.
5. Blandford, T. B., & Roberts, T. A., 1970. An outbreak of botulism in broiler chickens. *Veterinary Record*, 87, 258-261.
6. Chipault, J. G., White, C. L., Blehert, D. S., Jennings, S. K., & Strom, S. M. (2015). Avian botulism type E in waterbirds of Lake Michigan, 2010–2013. *Journal of Great Lakes Research*, 41(2), 659-664.
7. Circella, E., Camarda, A., Bano, L., Marzano, G., Lombardi, R., D’Onghia, F., & Greco, G. (2019). Botulism in Wild Birds and Changes in Environmental Habitat: A Relationship to be Considered. *Animals*, 9(12), 1034.
8. CNRB 30.012, 2021. https://www.iss.it/documents/20126/0/Metodo_CNRB30.012+%281%29.pdf/127e1605-828f-6ac6-3327-4882007099d3?t=1615198001209
9. CNRB 30.012. https://www.iss.it/documents/20126/0/Metodo_CNRB30.012+%281%29.pdf/127e1605-828f-6ac6-3327-4882007099d3?t=1615194401209.
10. Dohms, J. E., Allen, P. H., & Rosenberger, J. K. (1982). Cases of type C botulism in broiler chickens. *Avian diseases*, 204-210.
11. Duncan, R. M., & Jensen, W. I. (1976). A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. *Journal of Wildlife Diseases*, 12(1), 116-126.
12. EU reg. 2009/1099 https://presidenza.governo.it/USRI/ufficio_studi/normativa/1099%20del%202009.pdf.
13. Fillo, S., Giordani, F., Tonon, E., Drigo, I., Anselmo, A., Fortunato, A., Lista F., & Bano, L. (2021). Extensive Genome Exploration of *Clostridium botulinum* Group III Field Strains. *Microorganisms*, 9 (11), 2347.
14. Foreyt, W. J. & Abinanti, F. R. (1980). Maggot-associated type C botulism in game farm pheasants. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177(9), 827-828.
15. Franciosa, G., Fenicia, L., Caldiani, C., & Aureli, P. (1996). PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(4), 882-885.
16. Hannett, G. E., Stone, W. B., Davis, S. W., & Wroblewski, D. (2011). Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. *Applied and environmental microbiology*, 77(3), 1061-1068.
17. Hubalek, Z., & Halouzka, J. (1991). Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (*Calliphoridae*) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. *Journal of wildlife diseases*, 27(1), 81-85.

18. Jensen, W. I., & Price, J. I. (1987). The global importance of type C botulism in wild birds.
19. Miyazaki, S., & Sakaguchi, G. (1978). Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 31(1), 1-15.
20. Montecucco, C., G. Schiavo, & Tugnoli V. (1996). Botulism neurotoxins: mechanisms of action and therapeutic applications. *Mol Med Today*. 2:418–424.
21. Oguma, K. E. I. J. I., Yamaguchi, T. O. M. O., Sudou, K. E. I. K. O., Yokosawa, N. O. R. I. K. O., & Fujikawa, Y. O. K. O. (1986). Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxigenic derivatives. *Applied and environmental microbiology*, 51(2), 256-260.
22. Peck, M. W., Smith T. J., Anniballi F., Austin J. W., Bano L., Bradshaw M., Cuervo P., Cheng L. W., Derman Y., Dorner B. G., Fisher A., Hill K. K., Kalb S. R., Korkeala H., Lindström M., Lista F., Lúquez C., Mazuet C., Pirazzini M., Popoff M. R., Rossetto O., Rummel A., Sesardic D., Singh B. R. & Stringer S. C. (2017.) Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins* 9, 38
23. Segner, W. P., Schmidt, C. F., & Boltz, J. K. (1971). Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C. *Applied microbiology*, 22(6), 1017-1024.
24. Skarin, H., Hafstrom, T., Westerberg, J., & Segerman, B. (2011). *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics*, 12, 185-2164-12-185. doi:10.1186/1471-2164-12-185 [doi]
25. Souillard, R., Grosjean, D., Le Gratiet, T., Poezevara, T., Rouxel, S., Balaine, L., Macé S., Martin L., Anniballi F., Chemaly M., Le Bouquin S., & Le Maréchal, C. (2021). Asymptomatic carriage of *C. botulinum* type D/C in broiler flocks as the source of contamination of a massive botulism outbreak on a dairy cattle farm. *Frontiers in microbiology*, 12, 679377.
26. Souillard, R., Le Marechal, C., Ballan, V., Rouxel, S., Leon, D., Balaine, L., Poëzevara T., Houard E., Robineau B., Robinault C., Chemaly M., & Le Bouquin, S. (2017). Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France. *Avian Pathology*, 46(2), 195-201.
27. Takeda, M., Tsukamoto, K., Kohda, T., Matsui, M., Mukamoto, M., & Kozaki, S. (2005). Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. *Avian diseases*, 49(3), 376-381.
28. Vidal, D., Anza, I., Taggart, M. A., Pérez-Ramírez, E., Crespo, E., Hofle, U., & Mateo, R. (2013). Environmental factors influencing the prevalence of a *Clostridium botulinum* type C/D mosaic strain in nonpermanent Mediterranean wetlands. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4264-4271.
29. Wobeser, G. A. (1997). *Diseases of wild waterfowl*. Springer Science & Business Media.
30. Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene M., Bâyon-Auboyer M.H., Buffereau J.P., De Medici, D., Fach P. (2012). Neurotoxin gene profiling of *clostridium botulinum* types C and D native to different countries within europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3120-3127.

RESISTENZA DI *DERMANYSSUS GALLINAE* A PHOXIM E PIRETROIDI: LA SITUAZIONE STA CAMBIANDO?

Schiavone A.¹, Pugliese N.¹, Siddique I.¹, Samarelli R.¹ Saleh M.^{1,2}, Circella E.¹, Romito D.¹, Camarda A.¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro” S.P. per Casamassima, km 3, 70010 Valenzano (BA), Italia

² Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt

Summary

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1978), the poultry red mite (PRM), is a major threat in the poultry industry worldwide, due to its heavy impact on both animal health and production, the related economic losses, and its vectorial role in some infectious diseases. The control of the PRM is particularly challenging because of several factors, such as the upsurge of mite populations resistant to acaricides worldwide. An eight-year survey (2018-2015) on the susceptibility of Italian PRM populations to phoxim, amitraz, and l-cyhalothrin reported a decreasing trend in the efficacy of those drugs during the years. With this in mind, the study was aimed to investigate the evolution of the efficacy of some of those acaricides after eight years. Eleven PRM populations from Apulia and Campania were tested *in vitro* for their susceptibility to a 2X concentration of phoxim and cypermethrin with respect to those indicated by the manufacturer. The percent efficacy of the drugs was extremely variable, with overall mean values of 75.97% for phoxim and 49.05% for cypermethrin. Compared to the results from the previous survey, the trend of acaricide efficacy showed wide fluctuations during the years, mostly for phoxim, whose efficacy increased from 65% in 2015 to 75.97%. The obtained results confirm that acaricide resistance is still a concrete issue in the poultry industry, thus highlighting the pivotal role of a tailored strategy in the fight against *D. gallinae*.

INTRODUZIONE

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1978) è un acaro ematofago notturno particolarmente temuto nel settore avicolo intensivo, con una prevalenza che si assesta anche intorno al 90% in alcuni Paesi europei [1]. Questo acaro esercita un notevole impatto negli allevamenti infestati, che si manifesta direttamente sugli animali in termini di calo della deposizione, irritabilità, cannibalismo ed anemia, fino addirittura alla morte, in caso di infestazioni massive [1]. Non meno preoccupante è il ruolo che *D. gallinae* può assumere nel favorire la diffusione e la trasmissione di alcuni importanti agenti patogeni del pollame, tra cui *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e Gallinarum, ed il virus dell’Influenza aviare [2]. Gli effetti nocivi della presenza dell’acaro rosso si ripercuotono anche da un punto di vista economico, con perdite annuali stimate intorno ai 130 milioni di euro negli allevamenti europei, sia per le conseguenti perdite produttive, che per i trattamenti contro il parassita [3]. Il controllo delle infestazioni da *D. gallinae* risulta particolarmente difficile da attuare a causa di diversi fattori. Il ciclo biologico dell’acaro rosso, dalle uova allo stadio

di adulto, può completarsi anche in soli 7 giorni in condizioni ambientali favorevoli, rendendo così possibile il raddoppiamento della popolazione all'interno del capannone in una sola settimana [1]. In breve tempo, la densità della popolazione può raggiungere i 50.000 acari per ciascun animale, arrivando addirittura a 500.000 in caso di infestazioni massive [1]. Inoltre, *D. gallinae* può essere presente in modo permanente all'interno dei capannoni infestati, anche in assenza di animali durante il vuoto sanitario, riuscendo a sopravvivere persino 8 mesi senza compiere alcun pasto di sangue [4]. Oltre alle difficoltà legate alle proprietà biologiche dell'acaro, il controllo delle infestazioni è reso ancora più complicato dall'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti delle sostanze più comunemente utilizzate. Gli acaricidi sintetici e semisintetici sono tuttora la scelta più adottata, sebbene numerose soluzioni alternative siano state proposte a partire dagli ultimi anni [5]. In passato il controllo di *D. gallinae* si basava su composti perlopiù utilizzati in campo agricolo, come piretrine, piretroidi e carbammati, non autorizzati per l'utilizzo negli allevamenti avicoli, con la limitazione di non poter essere impiegati in presenza di animali [6]. Solo negli ultimi anni sono stati immessi sul commercio prodotti specifici per la lotta all'acaro rosso, quali phoxim, spinosad e, più recentemente, fluralaner, che rappresentano al momento la scelta d'elezione. Nel corso degli anni numerose segnalazioni di popolazioni di *D. gallinae* resistenti ad una o più di queste sostanze sono state riportate in molti Paesi, compresa l'Italia [5, 7]. In particolare, uno studio condotto su allevamenti di galline ovaiole italiani in un arco di tempo di 8 anni ha evidenziato come le percentuali di efficacia di l-cialotrina, phoxim e amitraz tendano a diminuire drasticamente nel corso del tempo [5]. Alla luce di tali considerazioni, questo studio si propone di portare avanti le ricerche precedenti, in modo da approfondire l'andamento della sensibilità agli acaricidi nell'acaro rosso in Italia, valutando se e come la situazione sia cambiata a distanza di 8 anni.

MATERIALI E METODI

Test di sensibilità

I campioni di *D. gallinae* sono stati prelevati da 11 allevamenti industriali di galline ovaiole in Puglia e Campania. Una volta raccolti, sono stati sottoposti ad un periodo di *starvation* per 5 giorni al buio e a temperatura ambiente.

È stata testata *in vitro* la sensibilità dei campioni di acari nei confronti di phoxim (Bye-Mite, Bayer Animal Health, Leverkusen, Germany) e cipermetrina (Bio Revanol, Sandokan, Italia). Gli acaricidi sono stati testati ad una concentrazione 2 volte superiore a quella consigliata dal produttore per l'uso in campo (2X).

Il test di efficacia è stato allestito tramite la tecnica per contatto descritta da Thind e Muggleton [8]. In breve, due sezioni di carta da filtro sono state impregnate con 200 mL di soluzione acaricida. Successivamente 20 acari sono stati posizionati sulla carta da filtro con un pennello. Le due sezioni sono state quindi sigillate tramite un sottile strato di colla vinilica lungo il margine esterno, realizzando così delle celle che sono state incubate per 24 h a 20°C. Al termine del periodo di incubazione, ciascuna cella è stata aperta e gli acari all'interno sono stati esaminati, registrando il numero di acari vivi e morti con l'aiuto di uno stereomicroscopio. Per ogni prova è stato eseguito un controllo negativo, utilizzando acqua al posto della soluzione acaricida. Per ciascuna popolazione di acari le prove sono state effettuate in triplicato.

La percentuale di efficacia è stata calcolata applicando la formula di Abbott [9], modificata tenendo conto della media dei tre replicati.

$$\% \text{ di efficacia} = \frac{(\text{media acari di controllo vivi} - \text{media acari trattati vivi})}{\text{media acari di controllo vivi} \times 100}$$

Sulla base della sensibilità agli acaricidi testati, le popolazioni di *D. gallinae* sono state classificate in quattro classi di efficacia (EC). Le popolazioni con una EC compresa tra 0-20% sono state considerate altamente resistenti (AR), tra 21-40% moderatamente resistenti (MR), tra 41-60% intermedie (I), tra 61-80% sensibili (S) e tra 81-100% altamente sensibili (AS).

Analisi statistica

La distribuzione normale delle percentuali di efficacia di phoxim e cipermetrina per le popolazioni di *D. gallinae* analizzate è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk. La normalità è stata considerata nulla per entrambi i gruppi ($p < 0.05$). Pertanto, sono stati calcolati il valore centrale e l'intervallo di confidenza al 90% (IC90) tramite lo stimatore del valore centrale di Hodges-Lehmann. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software R v.4.1.2 [10] ed il package DescTools v.0.99.44.

RISULTATI

La percentuale di efficacia per phoxim e cipermetrina ha mostrato ampie fluttuazioni all'interno delle diverse popolazioni di acari analizzate (Tabella 1). In particolare, l'efficacia del phoxim varia dal 9,5 al 100%, con un valore medio del 75,97% (IC90 = 48,6-85,55). Per la cipermetrina invece l'efficacia spazia dal 27,7 al 100%, con un valore medio del 49,05% (IC90 = 34,99-67,5).

Tabella 1. Percentuale di efficacia di phoxim e cipermetrina sulle popolazioni di *D. gallinae* testate.

Popolazione	Phoxim		Cipermetrina	
	% di efficacia	Classe di efficacia	% di efficacia	Classe di efficacia
Bari	71,10	S	98,48	AS
Napoli	81,70	AS	60,00	I
Caserta	9,50	AR	27,70	MR
Lecce	77,80	S	40,70	I
Lecce	100,00	AS	70,00	S
Lecce	87,70	AS	38,60	MR
Lecce	91,70	AS	35,00	MR
Lecce	86,40	AS	35,00	MR
Bari	16,70	AR	28,30	MR
Taranto	71,00	S	100,00	AS
Lecce	63,50	S	38,90	MR
Mediana	75,97		49,05	

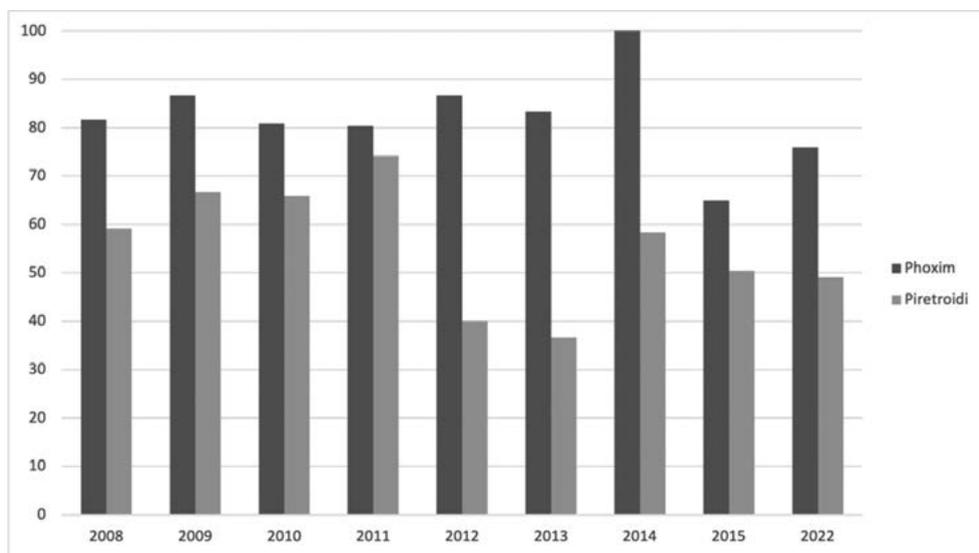
I valori ottenuti mediante i test di efficacia, analizzati in funzione dell'EC per phoxim e cipermetrina, sono elencati in Tabella 2.

Tabella 2. Distribuzione delle popolazioni di *D. gallinae* in funzione della classe di efficacia di phoxim e cipermetrina.

Classe di efficacia	Phoxim	Cipermetrina
Altamente sensibile	5/11 (45,4%)	2/11 (18,2%)
Sensibile	4/11 (36,4%)	1/11 (9,1%)
Intermedia	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
Moderatamente resistente	0/11 (0%)	6/11 (54,5%)
Altamente resistente	2/11 (18,2%)	0/11 (0%)

I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi al periodo di tempo compreso fra il 2008 e il 2015, riportati da Pugliese *et al.* [5] (Figura 1).

Figura 1. Andamento della percentuale di efficacia media del phoxim e dei piretroidi nei confronti di *D. gallinae* dal 2008 al 2022, sulla base della concentrazione 2X.



DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio hanno confermato, come già precedentemente evidenziato, che il fenomeno della resistenza agli acaricidi è un problema ancora molto presente in campo avicolo. Infatti, la percentuale di efficacia di due tra le sostanze più utilizzate per la lotta contro l'acaro rosso è risultata pari a 75,97% per il phoxim e 49,05% per la cipermetrina. Ciò che emerge maggiormente è soprattutto l'ampia fluttuazione dei valori di efficacia all'interno delle diverse popolazioni

analizzate. Per il phoxim la maggior parte delle popolazioni testate è risultata altamente sensibile (45,4%) o sensibile (36,4%), sebbene il 18,2% si sia dimostrato altamente resistente, con l'assenza di popolazioni intermedie o moderatamente resistenti. Al contrario, per la cipermetrina oltre la metà delle popolazioni testate è risultata moderatamente resistente (54,5%), mentre solo il 18,2% e il 9,1% ricadeva fra gli altamente sensibili e sensibili, rispettivamente.

Confrontando i dati ottenuti in questo studio con quelli relativi al periodo 2008-2015 [5], appare evidente che l'andamento dell'efficacia di phoxim e piretroidi non sia costante nel tempo, ma tenda piuttosto a manifestare ampie fluttuazioni. I piretroidi mostrano in generale una minore efficacia rispetto al phoxim, aspetto che si evidenzia nell'intero arco di tempo esaminato. Inoltre, sono soggetti a maggiori fluttuazioni nell'andamento della loro efficacia, sebbene la situazione sia rimasta piuttosto simile dal 2015 al 2022. Al contrario, l'efficacia del phoxim si è mantenuta piuttosto elevata e costante negli anni, fino al 2015, quando ha subito un notevole calo, con la comparsa delle prime popolazioni di acari resistenti. A distanza di 8 anni appare evidente come l'efficacia del phoxim sia nuovamente risalita, passando dal valore medio del 65% del 2015 al 75,97% del 2022.

Una possibile spiegazione per il trend dell'efficacia del phoxim è legata al fatto che fino a pochi anni fa era tra le uniche sostanze autorizzate per l'utilizzo in presenza di animali, insieme allo spinosad. In tal senso, dopo i primi anni di elevata efficacia, il suo impiego costante e talvolta quasi esclusivo potrebbe aver favorito l'insorgenza di resistenze. La recente introduzione del fluralaner ha diversificato la scelta dei prodotti da poter utilizzare, andando probabilmente a variare la sensibilità delle popolazioni di acari nei confronti delle altre sostanze presenti sul mercato. In questo modo, potrebbe anche aver determinato nel corso degli ultimi anni la risalita dell'efficacia di altri acaricidi con diverso meccanismo d'azione, come il phoxim.

Come già ampiamente constatato, infatti, l'efficacia degli acaricidi può essere compromessa dal loro uso eccessivo o improprio nel corso degli anni, soprattutto in termini di frequenza di applicazioni e concentrazioni utilizzate [6]. Tali condizioni possono facilmente favorire la comparsa di popolazioni di acari resistenti, grazie ad un meccanismo di pressione selettiva. Infatti, ad ogni trattamento la popolazione sensibile di partenza viene impoverita e progressivamente rimpiazzata da una sub-popolazione resistente, che possiede un carattere fenotipico più vantaggioso per la sopravvivenza della popolazione stessa. Questo fenomeno potrebbe giustificare l'elevata variabilità della sensibilità delle diverse popolazioni di *D. gallinae* analizzate. Infatti, i protocolli per il controllo dell'acaro rosso adottati in allevamento sono tutt'altro che standardizzati, variando soprattutto in funzione della scelta della sostanza da applicare e della frequenza dei trattamenti. In questo modo le popolazioni di acari vanno naturalmente incontro ad una diversificazione dei caratteri alla base della sensibilità alle sostanze acaricide, determinando la variabilità della risposta ai trattamenti.

Pertanto, alla luce di queste considerazioni, l'obiettivo principale nel controllo all'acaro rosso dovrebbe tener conto di tali considerazioni, cercando di evitare la selezione delle sub-popolazioni resistenti tramite la rotazione delle sostanze a disposizione e l'uso oculato degli acaricidi, in funzione della loro efficacia.

CONCLUSIONE

Alla luce dei risultati ottenuti in questo studio, appare evidente che il problema della resistenza di *D. gallinae* nei confronti di alcune delle sostanze più utilizzate, come phoxim e piretroidi, assuma ancora un ruolo rilevante. Sulla base di queste considerazioni e dei dati emersi da questo studio, appare chiaro che la strategia migliore per la lotta farmacologica all'acaro rosso non possa escludere dei programmi di rotazione delle sostanze a disposizione, così come la scelta di prodotti la cui efficacia sia prima verificata tramite prove di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and A Giangaspero. (2014). Significance and control of the Poultry Red Mite *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 447-466.
2. Schiavone A, Pugliese N, Otranto D, Samarelli R, Circella E, De Virgilio C and A Camarda. (2022). *Dermanyssus gallinae*: the long journey of the poultry red mite to become a vector. *Parasit. Vectors*, 15: 29.
3. R Van Emous. (2005). Wage war against the red mite! *Poult. Int.*, 44: 26-33.
4. C Chauve. (1998). The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Ve. Parasitol.* 79: 239-245.
5. Pugliese N, Circella E, Cocciolo G, Giangaspero A, Tomic DH, Kika TS, Caroli A and A Camarda. (2019). Efficacy of l-cyhalothrin, amitraz, and phoxim against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 (Mesostigmata: Dermanyssidae): an eight-year survey. *Avian Pathol.* 48: 35-43.
6. Marangi M, Morelli V, Pati S, Camarda A, Cafiero MA and A Giangaspero. (2012). Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. *PLoS ONE*, 7: e31795.
7. Katsavou E, Vlogiannitis S, Karp-Tatham E, Blake DP, Ilias A, Strube C, Kikoulos I, Dermauw W, Van Leeuwen T and J Vontas. (2019). Identification and geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Pest Manag. Sci.* 76: 125-133.
8. Thind BB and J Muggleton. (1998). A new bioassay method for the detection of resistance to pesticides in the stored product mite *Acarus siro* (Acari: Acaridae). *Exp. Appl. Acarol.* 22: 543-552.
9. WS Abbott. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925 *J. Am. Mosq Control Assoc.* 18: 265-267.
10. R Core Team. (2018). R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>.

IL LATO OSCURO DELLA QUALITÀ: INTOSSICAZIONE DA MICOTOSINE IN UN ALLEVAMENTO PER LA PRODUZIONE DI UOVA ARRICHITE IN OMEGA-3

Pugliese N.¹, Samarelli R.¹, Dimuccio M.M.¹, Bozzo G.¹, Ceci E., Schiavone A.¹, Circella E.¹, Saleh M.^{1,2}, Siddique I.¹, Crescenzo G.¹, Camarda A.¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" S.P. per Casamassima, km 3, 70010 Valenzano (BA), Italia

² Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt

Summary

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungal species that usually contaminate foods and feeds. Their lipophilic properties allow them to persist in the fat tissues of animals that ingest them, representing a risk for the consumers because of their toxicity and carcinogenicity. Apart from their toxicity to human, there are species more susceptible to the mycotoxin actions, such as the avian ones. This report describes a case in a laying hen farm certified as antibiotic free, where animals were fed with foodstuff with linseed added to obtain eggs enriched in omega-3 fat acids. In this case, the concurrent action of aflatoxin B and ochratoxin A caused a significant decrease in production and increase in mortality. At anatomo-pathologic examinations, the animals showed severe kidney degeneration along with liver lesions. Ovary and oviduct were hypoplastic, and evident signs of anemia were observed. Aflatoxin B and ochratoxin A were detected by HPLC in organs and in foodstuff with the addition of linseed. This case wants to drive attention to the importance of a careful check of the feedstuff to be used in poultry farms with a quality-oriented production, in order to avoid contaminations that can harm both the animal welfare and the public health.

INTRODUZIONE

Le micotossine sono prodotti secondari del metabolismo di molte specie di funghi, tra cui quelli appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* [1]. Essi sono contaminanti naturali di granaglie, frutta secca e foraggi [2], ma il loro sviluppo è favorito da temperature tra i 20 e i 35 °C (a seconda delle specie) e valori di attività dell'acqua (a_w) solitamente superiori a 0,92, con differenze specie-specifiche [3].

Gli animali da reddito destinati alla produzione di alimenti assumono le micotossine attraverso il mangime contaminato o preparato con materie prime contaminate. Quindi le micotossine, che sono lipofile, si accumulano nei tessuti e vengono escrete con il latte e le uova [2, 4]. Se per gli animali è possibile pensare a forme acute di intossicazione, in realtà sempre più rare, il consumo di alimenti contaminati porta nel tempo a fenomeni tossici di tipo cronico che possono coinvolgere anche l'uomo. Non è certamente di importanza secondaria la potenziale cancerogenicità delle micotossine [5], le quali, peraltro, non hanno tutte lo stesso grado di tossicità. Le aflatossine (AF), prodotte principalmente da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, sono tra le più pericolose. Infatti, è nota un'importante azione epatotossica a cui si sommano effetti cronici immunosoppressivi che favoriscono l'insorgenza di infezioni secondarie [6].

Inoltre, le aflatossine B1 (AFB1) ed M1 (AFM1) sono state rispettivamente inserite tra i carcinogeni di tipo I e 2B dall'Agencia Internazionale per la Ricerca sul cancro (IARC) [7]. Gli uccelli domestici sono particolarmente sensibili alle AF, che causano steatosi epatica, disturbi renali, deformità ossee e immunosoppressione, oltre a riduzione dell'accrescimento e riduzione della qualità delle uova deposte [4].

Le ocratossine (OT) sono invece considerate meno tossiche delle AF ma non per questo destano minore preoccupazione. In particolare, l'ocratossina A (OTA) è considerata nefrotossica, epatotossica, neurotossica, immunotossica ed è stata inserita tra i carcinogeni di classe 2B. Il pollame è particolarmente sensibile anche all'OTA, che causa anemia, alta concentrazione di urati, diarrea, calo di deposizione e riduzione della qualità delle uova [8]. L'elevata lipofilia dell'OTA, insieme con l'alta affinità per le proteine sieriche, ne determina il bioaccumulo nei tessuti, raggiungendo concentrazioni non compatibili con il consumo umano [9].

Per ridurre i rischi del consumatore e tutelare la salute degli animali da reddito, sono stati stabiliti dei limiti ben precisi per le AF e le OT nei mangimi destinati all'alimentazione degli animali. In particolare, il regolamento EU 574/2011 ha stabilito in 20 mg/kg la concentrazione massima di AFB1 nei mangimi per il pollame, e in 5 mg/kg quella nei mangimi per pulcini e pollastre. La concentrazione limite per l'OTA è stata invece stabilita dalle raccomandazioni UE 576/2006 in 100 mg/kg.

Alla luce di quanto sopra descritto, questo studio riporta le cause e gli effetti di un episodio di intossicazione da AFB1 e OTA osservato in un allevamento di galline ovaiole allevate senza antibiotici per la produzione di uova arricchite in acidi grassi ν -3 (O3).

MATERIALI E METODI

Storia del caso

L'azienda oggetto di studio è certificata “*Antibiotic free*” e, al momento dell'episodio descritto, ospitava 2 gruppi di 3600 galline ovaiole ciascuno, uno di ibridi Lohmann White e l'altro di Lohmann Red, in due capannoni distinti. Tutti gli animali erano stati accasati nel maggio 2021 ad un'età di 112 giorni ed erano allevati a terra al chiuso su lettiera. In particolare, il gruppo di Lohmann White produceva uova arricchite con O3, regolarmente certificate da un ente accreditato. L'arricchimento era ottenuto integrando l'alimentazione delle galline con quantità di semi di lino crescenti dal 3% (luglio 2021) al 7% (ottobre 2021).

La curva di deposizione, inizialmente sovrapponibile a quella indicata dalla casa madre per gli ibridi accasati, a dicembre 2021 si attestava su una percentuale del 95%. Nelle settimane successive, tuttavia, la produzione di uova calava drasticamente, fino a raggiungere in 21 giorni il 68%. In questo periodo al calo della deposizione non corrispondeva alcun aumento della mortalità (0,27% mensile).

A partire dal primo gennaio 2022, a causa dell'anomalo andamento della produzione, l'allevatore sospendeva l'integrazione con i semi di lino, al quale corrispondeva un aumento della deposizione che raggiungeva l'82%. Al ripristino dell'integrazione con semi di lino al 4%, corrispondeva con un nuovo calo di deposizione che raggiungeva questa volta il 70%, e che stavolta si associava ad un aumento significativo della mortalità (3,25% mensile).

Un capannone gemello, in cui la razione alimentare non era arricchita con semi di lino non ha manifestato alcuna sintomatologia clinica, né alterazioni della curva della deposizione e della mortalità per l'intero ciclo produttivo.

Per determinare la causa del calo della deposizione e dell'anomala mortalità dieci carcasse sono state sottoposte a esame necroscopico. Dagli animali esaminati sono stati prelevati fegato e reni. Contemporaneamente, in azienda sono stati raccolti cinque campioni di mangime addizionato con semi di lino al 4% e cinque di mangime non addizionato.

L'allevatore, contestualmente all'invio delle carcasse al laboratorio, sostituiva il mangime contenente i semi di lino con altro non addizionato che in quel periodo era somministrato al capannone gemello. Dopo pochi giorni la curva di deposizione si alzava nuovamente avvicinandosi a quella prevista dalle tabelle fornite dalla casa produttrice e la mortalità calava su livelli fisiologici per l'allevamento.

Esami istopatologici

Parte dei campioni raccolti durante l'esame necroscopico sono stati posti in formalina tamponata al 10%. I campioni sono stati quindi inclusi in paraffina secondo le procedure standard, sezionati a 4 mm con microtomo e colorati con ematossilina-eosina.

Estrazione e purificazione delle micotossine da organo

Aliquote da 20 g di organo sono state omogenizzate in acido fosforico 1M, e 2,5 g di omogenato sono stati trattati con etilacetato prima di essere centrifugate per 5' a 350xg. Le fasi organiche sono state combinate e sottoposte ad estrazione con NaHCO₃ 0,5 M, pH 8,4. L'estratto è stato purificato ulteriormente mediante passaggio in una colonna AflaOchra LC a immunoaffinità e le micotossine sono state eluite con alcol metilico.

Estrazione e purificazione delle micotossine da mangime

Al momento del conferimento presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari, il mangime è stato triturato e mantenuto a +4 °C. Aliquote da 25 g sono state successivamente omogenizzate in alcol metilico 70% e filtrate. Parte del filtrato è stato tamponato con PBS e sottoposto a purificazione in colonne AflaOchra LC. Le micotossine sono state eluite in alcol metilico.

Cromatografia liquida ad alta prestazione

Venti mL di eluito sono stati utilizzati per la ricerca di micotossine in cromatografia liquida, mediante uno strumento Agilent 1100 dotato di pompa, iniettore Rheodyne 7125 e rilevatore a fluorescenza. Nello specifico, il campione è stato introdotto in colonna Restek C18, e una miscela metanolo-acqua 45:55 v/v è stata usata come fase mobile per la mobilizzazione di AFB₁, con rilevazione a 360 e 440 nm come lunghezze d'onda rispettivamente di eccitazione e di emissione. L'OTA è stata mobilizzata con una miscela acetonitrile-acqua-acido acetico 99:99:2 e lunghezze d'onda di rilevazione di 333 e 477 nm [10].

RISULTATI

Rilievi anatomopatologici

All'esame necroscopico si evidenziava cattivo stato di nutrizione. La regione pericloacale era imbrattata di feci diarroiche di colorito giallastro, mentre le creste, i bargigli e le mucose apparenti apparivano di colorito pallido ad indicare un grave stato anemico (Fig. 1a). Anche il midollo osseo (Fig. 1b), si mostrava discromico rispetto alla normale condizione questa tipica degli stati aplastici.



Figura 1. a) Pallore di cresta e bargigli. b) Midollo osseo in cui è chiaramente evidente la decolorazione nella porzione distale.

I reni si presentavano di colorito giallo-ocra e con evidenti segni di sofferenza, quale ad esempio un consistente aumento di volume ed emorragie superficiali. Si osservava inoltre l'assenza di adiposi nelle logge renali (Fig. 2).

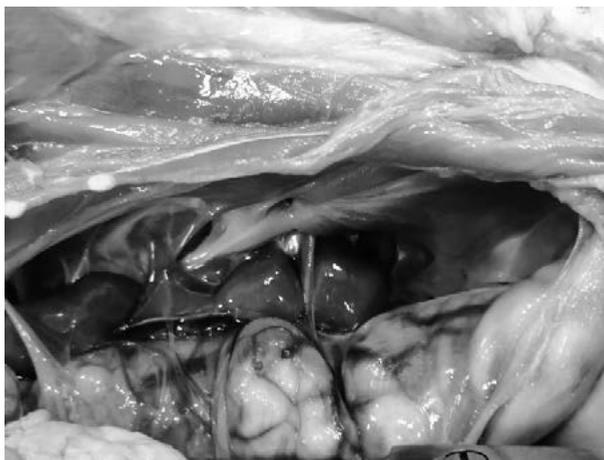


Figura 2. Reni ipocromici e ipertrofici. Si apprezza anche l'ipoplasia dell'ovidutto. Quest'ultimo segno era probabilmente legato allo stato di denutrizione degli animali, e si associava a una palese riduzione di volume dello stomaco muscolare. Ioplastico risultava anche l'apparato riproduttore, con evidente regressione di ovario e ovidutto (Figg. 2 e 3).

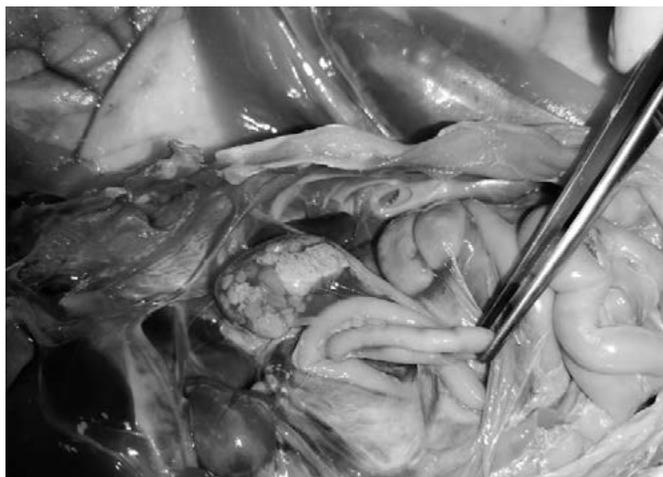


Figura 3. Iperplasia di ovario e ovidutto.

I depositi di urati evidenziabili sul peritoneo (Fig. 4a) e sui sacchi aerei (Fig. 4b) erano probabilmente direttamente correlati con alterazioni metaboliche dei reni.

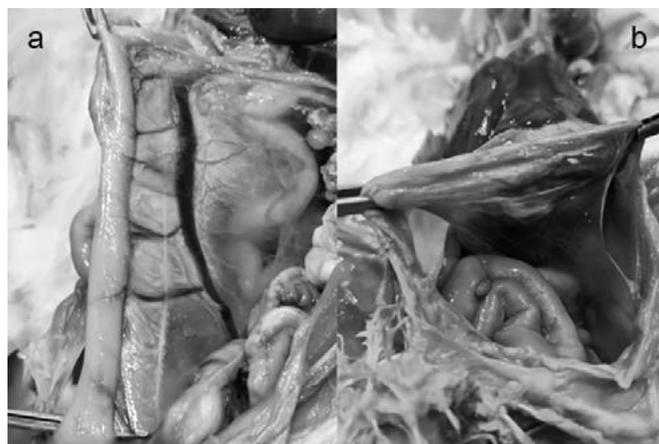


Figura 4. Depositi di urati sul peritoneo (a) e sulle membrane dei sacchi aerei addominali (b).

L'esame necroscopico metteva in luce anche importanti lesioni epatiche quali epatomegalia, e focolai necrotici diffusi.

L'esame istologico confermava i rilievi anatomopatologici rilevando importanti lesioni renali ed epatiche. Infatti, la sezione trasversale del rene mostrava le cariomegalia e vacuolizzazione delle cellule dei tubuli prossimali con degenerazione dei nuclei, che delineava un quadro complessivo di tubulonefrosi (Fig. 5a) e fibrosi interstiziale. La base dei capillari glomerulari risultava inspessita. Si evidenziava infine una diffusa atrofia dei glomeruli (Fig. 5b).

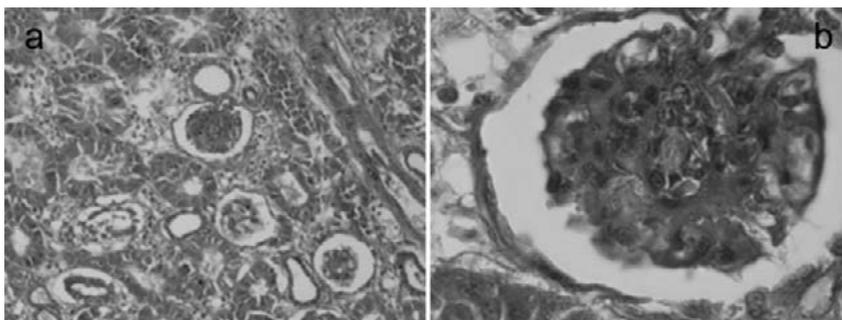


Figura 5. Rene. Cellule vacuolate con degenerazione nucleare (a, 20X) e atrofia glomerulare (b, 40X).

A livello del fegato si apprezzavano alterazioni degenerative del parenchima, caratterizzate da iperplasia nodulare degli epatociti, focolai di cellule infiammatorie e modesta fibrosi focale (Fig. 6a). Erano visibili anche numerosi epatociti con infiltrazione grassa ed erano visibili focolai emorragici ed aree congeste (Fig. 6b).

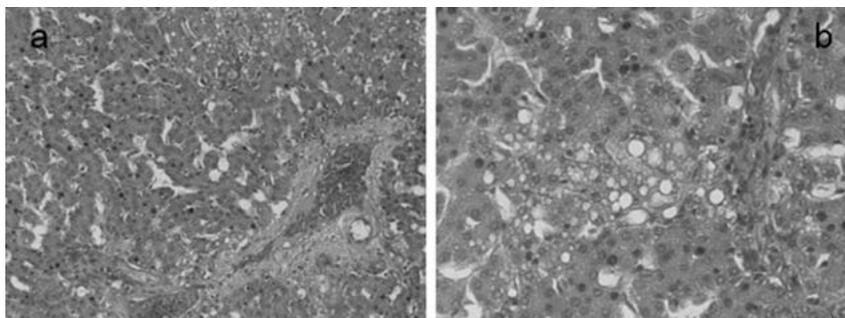


Figura 6. Fegato. Si osserva infiltrazione a focolaio di cellule infiammatorie ed aree di congestione circondate da fibrosi focale (a, 20X), oltre che infiltrazione grassa a carico degli epatociti (b, 40X).

Rilevamento e quantificazione delle micotossine.

Entrambe le micotossine ricercate, AFB e OTA, sono state rilevate e quantificate nei campioni di fegato e rene sottoposti ad HPLC. In particolare, la concentrazione media di AFB era di $3,6 \pm 0,44$ mg/kg nel fegato, e di $1,4 \pm 0,3$ mg/kg nel rene, mentre per l'OTA si ottenevano valori medi di $47 \pm 0,3$ mg/kg nel rene e di $24 \pm 1,92$ mg/kg nel fegato.

Anche i campioni di mangime addizionati con semi di lino sono risultati contaminati da OTA e AFB a concentrazioni medie di $31 \pm 3,08$ e $5,6 \pm 0,33$ mg/kg di peso secco, rispettivamente. Nel mangime senza addizione di semi di lino l'AFB non era invece stata rilevata, e anche la concentrazione di OTA era decisamente più bassa ($1,1 \pm 0,15$ mg/kg).

Il limite di rilevamento era pari a $0,10$ mg/kg e $0,25$ mg/kg, rispettivamente per OTA e AFB.

DISCUSSIONE

Il caso descritto in questa nota offre diversi spunti di riflessione che riguardano specificamente sia gli effetti patologici che le micotossine hanno sugli animali, sia aspetti più strettamente normativi, i quali sono indirizzati a ridurre il rischio di sviluppare micotossicosi durante il ciclo di allevamento ed evitare la produzione e commercializzazione di alimenti contaminati e quindi potenzialmente pericolosi.

Infatti, il quadro anatomopatologico osservato non è riconducibile all'azione di una specifica micotossina ma è probabilmente da attribuire ad una patologia ad eziologia tossica ad andamento cronico dovuta all'azione combinata di AF e OT.

Il quadro osservato, pertanto, è da considerare misto e contempera sia aspetti patologici legati ad una o all'altra delle due tossine. Per quanto riguarda le AF, ad esempio, se da un lato, sono assenti o poco presenti le alterazioni macroscopiche tipiche dell'intossicazione soprattutto a livello del fegato, che rappresenta l'organo bersaglio, ben più significativo è il quadro istopatologico dello stesso organo che è molto più rispondente a quanto descritto in letteratura in questi casi [11].

Inoltre, particolarmente evidenti sono le alterazioni patologiche primarie del rene (aumento di volume, decolorazione e presenza di urati disseminati sui foglietti sierosi), e gli effetti secondari sulle sierose (accumulo di urati) attribuibili all'azione delle OT [12, 13]. Molto interessante l'effetto della patologia tossica sullo sviluppo dell'ovaio e dell'ovidutto, ritrovati quasi costantemente ipoplastici, che motivano il significativo calo della deposizione registrato durante il ciclo produttivo [14].

Gli esami tossicologici confermano un accumulo anomalo di micotossine a livello del fegato e del rene che è compatibile con il quadro clinico e anatomopatologico riscontrato. Va rilevato, tuttavia, che le quantità di tossine presenti negli organi erano di gran lunga al di sotto delle DL50 determinate per ciascuna di esse, stimata per l'OTA a 3,3 mg/kg [9], e per l'AFB compresa tra 0,025 e 2 mg/kg, essendo quest'ultima influenzata dal sesso, dall'età e persino dall'ibrido [11, 15].

Molti Autori evidenziano l'importanza delle intossicazioni multiple nelle forme cliniche di micotossicosi [12]. Questa interazione può essere di vario tipo, ma più spesso esita in un'azione sinergica esercitata dai diversi tossici, i quali sarebbero in grado di esprimere il proprio potenziale patologico anche a concentrazioni molto più basse rispetto a quelle ritenute limite [12, 16]. Non è escluso che nell'episodio citato, come già anticipato precedentemente, si sia verificata proprio questa condizione, che ha portato alla comparsa della sintomatologia clinica in presenza di livelli di tossine che, al contrario, presi singolarmente, non sarebbero stati tossici.

Gli effetti patologici esercitati dalla contemporanea presenza delle due tossine si possono osservare sia nel fegato che nel rene [17]. È a livello di quest'ultimo, tuttavia, che l'azione sinergica ha raggiunto il massimo dell'attività [17], determinando un significativo aumento di volume dell'organo e le alterazioni fisiopatologiche che possono portare alla morte l'animale. L'OTA, infatti, tende a legarsi tenacemente alle proteine sieriche, allungando quindi sensibilmente i tempi di eliminazione e favorendo i fenomeni di bioaccumulo nel fegato e nei reni [18].

Veicoli principali delle micotossine sono certamente i mangimi. Per questo, il regolamento EU 574/2011 e la raccomandazione UE 576/2006 definiscono quali siano i livelli massimi di AF e OTA accettabili nel prodotto finito. Questi limiti infatti, tengono conto della capacità di detossificazione fisiologica dell'organismo animale, dovrebbero impedire il verificarsi di fenomeni tossici e nel contempo ridurre il

rischio di contaminazione degli alimenti (carni e uova) destinati all'alimentazione umana. L'episodio descritto sembrerebbe evidenziare, che le prescrizioni normative non sono in grado di impedire il verificarsi di fenomeni tossici in caso di contemporanea presenza di almeno due micotossine e suggeriscono la necessità di una verifica dei limiti accettabili nel caso di contemporanea presenza delle stesse nei mangimi o nelle materie prime.

Un particolare singolare, ma allo stesso tempo importante dell'episodio riportato in questa nota è che molto probabilmente la fonte di contaminazione del mangime era individuabile nei semi di lino utilizzati come integrazione per consentire alle uova di rientrare nei parametri utili ad ottenere la certificazione di uova arricchite con Omega 3. Questi, infatti, costituivano l'unico elemento di differenziazione nell'alimentazione delle ovaiole che presentavano la sintomatologia tossica rispetto al gruppo privo di tale certificazione.

La ricerca di produzioni di elevata qualità in grado di occupare nicchie di mercato sempre più ampie grazie alla capacità di attrarre il consumatore oggi più che mai attento ai temi salutisti, deve stimolare i produttori a porre un'attenzione maggiore alla qualità delle materie prime utilizzate. In tal senso il nuovo Reg. UE n° 2017/625 che disciplina i Controlli Ufficiali, rappresenta uno strumento innovativo a disposizione del medico veterinario. Infatti, attraverso la corretta interpretazione giuridica del Regolamento i controlli non si fermeranno al concetto di catena alimentare, ma saranno estesi a quello ben più ampio di filiera agroalimentare.

Questo al fine di garantire che produzioni che hanno costi elevati sia in filiera che al mercato rispondano pienamente alle aspettative e consentano di perseguire l'obiettivo per cui sono realizzate che, oltre alla qualità del prodotto, certamente importante, spesso si configura specificamente in una promozione dell'immagine aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM and MC Giffel. (2008) Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J. Dairy Sci.* 91: 4261-4271.
2. Rodríguez-Blanco M, Ramos AJ, Prim M, Sanchis V and S Marín. (2020) Usefulness of the analytical control of aflatoxins in feedstuffs for dairy cows for the prevention of aflatoxin M₁ in milk. *Mycotoxin Res.* 36: 11-22.
3. Zingales V, Taroncher M, Martino PA, Ruiz MJ and F Caloni. (2022) climate change and effects on molds and mycotoxins. *Toxins.* 14: 445.
4. Haque MA, Wang Y, Shen Z, Li X, Saleemi MK and C He. (2020) Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microb. Pathog.* 142: 104095.
5. Cimbalo A, Alonso-Garrido M, Font G and L Manyes. (2020) Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food Chem. Toxicol.* 137: 111161.
6. Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK and SG Kang. (2017) Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Front. Microbiol.* 7: 2170.
7. Marchese S, Polo A, Ariano A, Velotto S, Costantini and L Severino. (2018) Aflatoxin B1 and B1: Biological properties and their involvement in cancer development. *Toxins.* 10: 214.

8. Navale V, Vamkudoth KR, Ajmera S and V Dhuri V. (2021) *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. *Toxicol. Rep.* 8: 1008-1030.
9. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk D, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L, Leblanc JC, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Alexander J, Dall'Asta C, Mally A, Metzler M, Binaglia M, Horvath Z, Steinkellner and M Bignami. (2020). Risk assessment on ochratoxin A in food. *EFSA J.* 148: e06113.
10. Monaci L, Tantillo G and F Palmisano. (2004). Determination of ochratoxin A in pig tissues by liquid-liquid extraction and clean-up and high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 1777-1782.
11. RR Dalvi. (1986). An overview of aflatoxicosis of poultry: its characteristics, prevention and reduction. *Vet. Res. Commun.* 10: 429-443.
12. Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, Berthiller F, Applegate TJ, Grenier B, Phillips TD and G Schatzmayr. (2015). Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counter-acting strategies. *Poult. Sci.* 94: 1298-1315.
13. Haschek WM, Voss KA and VR Beasley. (2002). Selected mycotoxins affecting animal and human health. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA. (Eds.), *Handbook of toxicologic pathology.* Academic Press, Cambridge, MA, US, pp. 645-699.
14. Trucksess MW, Stoloff L, Young K, Wyatt RD and BL Miller. (1983). Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. *Poult. Sci.* 62: 2176-2182.
15. Bryden WL, Cumming RB and AB Lloyd. (1980). Sex and strain responses to aflatoxin B1 in the chicken. *Avian Pathol.* 9: 539-550.
16. Grenier B and IP Oswald. (2011). Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. *World Mycotoxin J.* 3: 285-313.
17. Huff WE and JA Doerr. (1981). Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poult. Sci.* 60: 550-555.
18. Pozzo L, Cavallarin L, Antoniazzi S, Guerre P, Biasibetti E, Capucchio MT and A Schiavone. (2013). Feeding a diet contaminated with ochratoxin A for broiler chickens at the maximum level recommended by the EU for poultry feeds (0.1 mg/kg). 2. Effects on meat quality, oxidative stress, residues and histological traits. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97 Suppl 1: 23-31.

RUOLO DELL'INCUBATOIO NELL'EPIDEMIOLOGIA DELLA RUNTING-STUNTING SYNDROME (RSS) E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI AVIAN NEPHRITIS VIRUS (ANV)

Grego E.¹, Bertolotti L.¹, Stella M.C.¹, Catania A.M.¹, Castellina C.²

¹*Università degli studi di Torino, Dipartimento Scienze Veterinaria, Via largo Paolo Braccini 2, 10094 Grugliasco (TO), Italia*

²*Aglietto natura s.r.l.*

Summary

Astrovirus is an emerging problem in hatchery management and is responsible of great economic losses in poultry farm worldwide. CAstV/ANV are involved in the hatching decrease caused by embryo deaths, chicks too weak to hatch and pale, runted chicks. Hatchery diseases are thought to occur with a direct egg infection or vertical transmission. Indeed what is the role of hatchery in the disease transmission? A high quality Piedmont (Italy) hatchery was submitted to an environmental and eggs/animals sampling to evaluate the presence of astrovirus. No positivity results was obtained from the hatchery environmental samples and external egg surface. Instead yolk sack at 18th day incubation, gut contents of 1 day chicks and the maps used for chicks transport resulted positive to ANV real time PCR. Furthermore, CastV was present at high copy number in samples collected from hatchery while ANV was more abundant in farms. This study confirm the vertical transmission for both virus with prevalence of amplification of CastV in tissues from hatchery and ANV in tissue from farm. Moreover the first Italy ANV complete genome was obtained from the gut content of 1 to 7 day chick.

INTRODUZIONE

La sindrome da malassorbimento o Runting-Stunting Syndrome (RSS) è una patologia che provoca gravi perdite economiche nel settore dell'avicoltura globale, legate alla scarsa conversione alimentare, alla minore uniformità del gruppo e conseguente scarto dei polli affetti al momento della macellazione. Si tratta di una patologia emergente che negli ultimi vent'anni ha acquisito crescente interesse (Smyth et al., 2009).

Si tratta di una sindrome multifattoriale principalmente a eziologia virale multipla che colpisce il pollo da carne nelle prime due settimane di vita, determinando ritardo di accrescimento, feci diarroiche, problemi scheletrici e anomalie del piumaggio (Smyth, 2008).

Un ruolo importante nella RSS è svolto dall'Avian Nephritis Virus (ANV) e dal Chicken Astrovirus (CAstV), membri della famiglia Astroviridae e in particolare del genere Avastrovirus 2. Sono state infatti riscontrate cariche virali più elevate in campioni di animali affetti rispetto a campioni di soggetti sani. È stato inoltre dimostrato essere responsabili dei problemi di crescita, di enterite e lesioni renali nei pulcini (Devaney et al., 2016).

Recentemente, gli astrovirus degli avicoli sono stati anche associati a problematiche riscontrate in incubatoio, con riduzione della schiudibilità, morte embrionale tardiva e nascita di pulcini deboli (Smyth et al., 2013; Sajewicz-Krukowsk et al., 2016). Tuttavia, non esistono al momento studi che valutino il ruolo dell'incubatoio nella diffusione di questi virus.

Gli astrovirus degli avicoli hanno una distribuzione mondiale e le infezioni sono molto comuni. Nel Regno Unito si segnala una prevalenza del 93 - 96% in allevamenti di polli da carne con problemi di crescita ritardata (Todd et al., 2009). A tal proposito Smyth et al. (2010), tramite l'ausilio della real time RT-PCR, hanno rilevato CAstV e ANV rispettivamente nell'81% e nel 67% dei casi, a partire da campioni di contenuto intestinale prelevati in due gruppi di polli da 0 a 35 giorni con prestazioni sotto la media.

In Italia la situazione non sembra essere diversa. Sono riportati casi, riconducibili ad astrovirus, di enterite e aumento della mortalità in soggetti giovani di pollo, tacchino e faraona nonché di epatite in anatrocchi, maggiormente segnalati in allevamenti intensivi (Canelli et al., 2012).

Questo studio si prefigge l'obiettivo di quantificare la carica virale dei virus oggetto di studio, vista la loro presenza di tipo ubiquitario sul territorio e di valutare il ruolo dell'incubatoio nell'epidemiologia della RSS in Piemonte.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I campioni sono stati prelevati tra ottobre 2018 e settembre 2019 presso l'allevamento dei parents per valutare la presenza di Ac verso CAstV ed ANV e successivamente, nell'incubatoio di destinazione delle uova dove si sono verificati dei problemi di schiusa, nascita di pulcini deboli e problemi di accrescimento nell'allevamento di destinazione.

Sono stati prelevati 295 campioni: 100 cartine sporche di feci di pulcino al primo giorno di vita prelevate nelle scatole adibite al loro trasporto; cartine nuove prive di feci e 5 cartine nuove; 20 tamponi ambientali delle varie aree (2 all'interno della cella di incubazione, 2 fuori dalla cella di incubazione, 2 dell'area di stoccaggio uova e 2 dell'area di stoccaggio pulcini); 5 tamponi dell'acqua utilizzata nei diversi impianti di nebulizzazione e dell'acqua di scolo delle celle di incubazione; 60 tamponi eseguiti sulla superficie esterna di uova in attesa di essere incubate (Figura 1); 30 sacchi vitellini di embrioni al 18esimo giorno di incubazione (su scarti del processo di incubazione) (Figura 2); 45 campioni di contenuto intestinale di broiler 1-7 giorni morti in allevamento e provenienti da uno degli allevamenti di destinazione dei pulcini nati in incubatoio.



Fig.1



Fig.2

Elisa Test

I campioni di siero prelevati dai parents sono stati inviati presso un laboratorio analisi IZS Forlì esterno per la ricerca degli Ac verso CAstV ed ANV

Estrazione e real time PCR:

L'Estrazione del RNA è stato effettuato utilizzando il reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific) secondo protocollo e quantificato mediante NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

La One-step RRT-PCR per CAstV ed ANV è stata eseguita in 20µL utilizzando i primers e probe dell'articolo (Smith et al. 2010), inserendo la curva standard per renderla quantitativa. Protocollo : 10µL 2x One Step PCR Mix (sensi Fast Probe HI-ROX one step kit, BIOLINE), 1µL Enzyme Mix (Bioline) containing reverse transcription enzyme e DNA polymerase, 0.35µL CAstV probe (20µM), 0.35µL ASN probe (20µM), 0.4µL CAstV forward primer (20µM), 0.4µL CAstV reverse primer (20µM), 0.4µL ASN forward primer (20µM), 0.4µL ASN reverse primer (20µM), 5µL RNA sample, and 0.3µL RNase-free water. La reazione è stata eseguita nel ABI 7300 real time PCR instrument (Applied Biosystems) con il seguente programma: 15min at 55°C, 5min at 95°C, 40 cycles of 5s at 95°C and 34s at 60°C. Controllo negativo e positivo sono stati inseriti per ogni reazione. I dati sono stati analizzati con 7300 Software (Applied Biosystems). Alcuni campioni positivi sono stati sequenziati presso il servizio esterno di BMR Genomics, Padua, Italy. I frammenti sono stati poi clonati nel vettore procaryote pCR-XL-TOPO Invitrogen, Thermo Fisher Scientific come da protocollo. Dai plasmidi sono state preparate delle diluizioni seriali: 5×10⁵, 5×10⁴, 5×10³, 5×10², 5×10¹, 5×10⁰ copie di DNA/ 5 µL per la curva standard e poter effettuare una quantificazione mediante real time PCR di tipo assoluto.

Sequenziamento NGS:

L'RNA estratto dal campione selezionato è stato utilizzato per la sintesi di double stranded cDNA (Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA).

Il cDNA è stato utilizzato per la preparazione di libreria Illumina (Nextera XT kit, Illumina, San Diego, USA)

Il sequenziamento è stato condotto su piattaforma MiSeq (Illumina, San Diego, USA), utilizzando un sequenziamento paired-end 2x150bp.

RISULTATI

Come prima analisi è stata valutata la presenza di Ac anti CAstV/ANV nei Parents, da cui provengono le uova che hanno dato esito positivo.

Tutti i campioni ambientali prelevati dall'incubatoio sono risultati negativi per CAstV/ANV, insieme ai 60 tamponi effettuati sulla superficie delle uova e le cartine nuove usate come controllo.

88 su 100 carte di trasposto (post utilizzo) sono risultate positive con una carica virale maggiore di 5x10³ per CAstV e circa 4x10³ per ASN. 57 sono risultate positive a CAstV, 11 a ASN 10 co-infettate.

16 su 30 sacchi embrionali al 18 giorno di incubazione sono risultati positivi per CAstV PCR con una carica virale media di 5x10⁴ e 3 per ANV 3x10², di cui 2 mostravano una confezione.

Tutti i contenuti intestinali (1 to 7 days) analizzati sono risultati positive (n=30), 11 su 30 per la ricerca di ANV con carica virale elevata corrispondete ad un numero di copie maggiore di 5×10^5 , 13 positive per CastV con carica virale compresa tra 2×10^1 to 3×10^2 e 6 risultavano co-infetti.

Sequenziamento NGS

Sono state ottenute un totale di 960.618 reads (144Mbp). L'analisi di resequencing ha mostrato come le reads ottenute trovassero la maggiore similarità verso i ceppi di Avian nephritis virus 2.

In particolare un totale di 105 reads hanno trovato corrispondenza verso Avian nephritis virus 2 strain AVE52/ANV2 (MH028405).

La corrispondenza è ristretta alla ORF1, in particolare la ORF1b, mentre nessuna read è stata identificata nella ORF2.

Successive analisi hanno portato alla caratterizzazione di una regione parziale della ORF2 la quale, secondo le similarità ottenute dal paragone con le sequenze parziali disponibili in rete, è simile a Avian nephritis virus 2 isolate ANV-EF91-276-C13 (HQ330485). Considerando la regione del genoma omologa a ORF1b, la similarità tra il ceppo identificato in questo studio e le reference di Avian nephritis virus è pari a 89,4%-86,4%, mentre i ceppi di Chicken astrovirus sono risultati al massimo 59% simili.

DISCUSSIONE

In questo studio è stata ottimizzata una real time di tipo quantitativo per CAstV e ANV da utilizzare per l'analisi di campioni provenienti da un incubatoio con problemi di schiusa e pulcini gracili e problemi di accrescimento nell'allevamento di destinazione. I dati ottenuti mostrano un elevata carica virale di CAstV, rispetto al ANV, nei prelievi di campioni fatti dagli animali presenti in incubatoio, viceversa nei campioni prelevati in allevamento (1-7 giorni) si osserva un netto aumento della carica virale di ANV rispetto a quella di CAstV, probabilmente dovuto al differente tropismo tra ANV e CAstV. Inoltre la bassa carica virale di ANV potrebbe permettere a certe uova di schiudere ed aiuta a spiegare l'elevata carica virale riscontrata in allevamento.

Da campioni prelevati in allevamento è stato possibile ottenere il primo genoma completo di ANV in Italia da pulcini di 1-7 giorni di vita. L'analisi filogenetica rivela l'appartenenza del nuovo ceppo al gruppo di Avian nephritis virus 2. Inoltre un numero inferiore di reads indica chiaramente la presenza di un secondo ceppo virale: in particolare il secondo ceppo risulta maggiormente simile a ceppi di CastV, confermando una possibile coinfezione da parte di virus geneticamente correlati.

Ulteriore obiettivo di questo progetto era quello di valutare il ruolo dell'incubatoio nella trasmissione dell'astrovirus. I dati ottenuti tramite analisi con real-time RT-PCR quantitativa sui campioni ambientali hanno permesso di escludere l'incubatoio tra le fonti di trasmissione virale e di consolidare l'ipotesi di trasmissione verticale di CAstV e ANV. Infatti i virus sono infatti stati identificati a partire da sacchi vitellini prelevati direttamente in ovo al 18esimo giorno di incubazione.

Ulteriori analisi saranno necessarie per chiarire ulteriormente il ruolo epidemiologico dell'incubatoio nella dinamica di trasmissione della RSS e per valutare il tropismo di ANV and CAstT in embrioni ed in pulcini nelle prime settimane di vita.

BIBLIOGRAFIA

1. Canelli E., Cordioli P., Barbieri I., Catella C., Pennelli D., Ceruti R., Moreno A., Lavazza A., (2012). Astroviruses as causative agents of poultry enteritis: Genetic characterization and longitudinal studies on field conditions. *Avian Diseases* 56:173–182.
2. Devaney R., Trudgett J., Trudgett A., Meharg C., Smyth V., (2016). A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting-stunting syndrome and from normal birds. *Avian Pathology* 45(6):616-629.
3. Sajewicz-Krukowska J., Pać K., Lisowska A., Piķuła A., Minta Z., Króliczewska B., Domanska-Blicharz K., (2016). Astrovirus-induced “white chicks” condition – field observation, virus detection and preliminary characterization. *Avian Pathology* 45(1):2-12.
4. Smyth J.A., (2008). Runting/Stunting/Cystic enteritis syndrome. North Carolina Broiler Supervisor’s Short Course 19.
5. Smyth V.J., Jewhurst H.L., Adair B.M., Todd D., (2009). Detection of chicken astrovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 38(4):293-299.
6. Smyth V.J., Jewhurst H.L., Wilkinson D.S., Adair B.M., Gordon A.W., Todd D., (2010). Development and evaluation of real-time TaqMan® RT-PCR assays for the detection of avian nephritis virus and chicken astrovirus in chickens. *Avian Pathology* 39(6):467-474.
7. Smyth V.J., Kaukonen E., Trudgett J., Wylie M., Jewhurst H., Conway B., Welsh M.D., Todd D., (2013). Chicken astrovirus detected in hatchability problems associated with “White Chicks”. *Vet. Rec.* 173:403–404.
8. Todd D., Smyth V.J., Ball N.W., Donnelly B.M., Wylie M., Knowles N.J., Adair B.M., (2009). Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathology* 38(1):21-29.

AGGIORNAMENTO EPIDEMIOLOGICO SUL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA IN EUROPA OCCIDENTALE

Legnardi M.¹, Franzo G.¹, Tucciarone C.M.¹, Tonellato F.R.², Koutoulis K.C.³, Cecchinato M.¹

¹ *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italia*

² *CEVA Salute Animale Italia, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB)*

³ *Dipartimento di Malattie Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università della Tessaglia, Trikalon 224, 43100 Karditsa, Grecia*

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is a highly variable RNA virus that is responsible of an immunosuppressive disease of chickens known as infectious bursal disease (IBD). Despite the significant burden of IBD, the subclinical nature of the infection caused by many of the currently circulating IBDV types means that viral presence is easily overlooked, thus requiring a scrupulous monitoring to fully understand IBDV epidemiology. Accordingly, the present study has been performed to provide an update on the IBDV epidemiological scenario in Western Europe by considering the results of diagnostic activities performed throughout 2021 on bursal samples collected in nine different countries. In total, 393 out of 470 samples tested positive. When a field strain was detected, further investigations were carried out, allowing to obtain high-quality sequences of portions of both genome segments for 113 viruses. Three types of field strains were subsequently characterized following a phylogeny-based classification scheme: in detail, 116 strains found in Belgium, Denmark, France, Germany, the Netherlands, Portugal and the United Kingdom were labeled as reassortants with a very virulent-like VP2 and a classical-like VP1 (genotype A3B1) and were highly similar to strains that have been reported since 2017 in several North-Western European countries. Eleven additional A3B1 strains were found in Italy, but clustered separately from other European countries and together with viruses whose presence was only ever signaled in Russia, Kazakhstan and the Middle East. Lastly, 15 strains detected in Portugal belonged to the recently described A9B1 genogroup, confirming its circulation at local level.

Despite almost all samples came from vaccinated flocks, the obtained results show that field IBDVs are circulating extensively in all the investigated countries but Spain, and that the North-Western European reassortant strains have rapidly affirmed themselves as the dominant field threat in the region. These findings demand for attentive monitoring activities to be conducted in these and other countries, along with research efforts to better understand the pathogenic and antigenic features of the detected strains and thus their actual clinical and economic impact.

INTRODUZIONE

La bursite infettiva (IBD), anche nota come malattia di Gumboro, è una patologia

virale immunosoppressiva dal notevole impatto sanitario ed economico sull'avicoltura mondiale, ascrivibile sia a focolai caratterizzati da sintomi aspecifici e elevata mortalità che alle conseguenze dell'immunosoppressione, come l'aumento dell'incidenza di infezioni secondarie e di fallimenti vaccinali e il peggioramento dell'indice di conversione alimentare (Alkie & Rautenschlein, 2016). L'agente eziologico della malattia è noto come virus della bursite infettiva (IBDV) e appartiene al genere *Avibirnavirus* della famiglia *Birnaviridae*. IBDV possiede un genoma a RNA a doppio filamento composto di due segmenti, denominati A e B. Il segmento A codifica per la proteina capsidica (VP2), una proteina *scaffold* (VP3), una proteasi (VP4) e una proteina non strutturale (VP5), mentre il segmento B codifica per la RNA polimerasi RNA-dipendente (VP1) (Maraver et al., 2003). Tra le proteine virali, la VP2 risulta essere quella più studiata per via del suo ruolo di principale determinante antigenico e patogenetico (Brandt et al., 2001). Ciononostante, è stato dimostrato come anche la VP1 concorra alla determinazione della patogenicità (Escaffre et al., 2013). Per questo motivo, e per via della rilevanza dei fenomeni di riassortimento per l'evoluzione di IBDV, diverse combinazioni dei due segmenti possono esitare in significative differenze patobiologiche (He et al., 2016; Chen et al., 2018).

Sono noti due sierotipi di IBDV, denominati 1 e 2. Il sierotipo 1 è l'unico a causare la malattia ed è tradizionalmente suddiviso sulla base di differenze antigeniche e patogenetiche. I tre sottogruppi storicamente considerati più rilevanti sono rappresentati dai ceppi classici, i primi ad essere identificati e responsabili della sintomatologia comunemente attribuita ad IBD; i ceppi varianti, caratterizzati da un diverso profilo antigenico e associati a infezioni a carattere subclinico accompagnate da una marcata atrofia della borsa di Fabrizio; e i ceppi *very virulent*, che al contrario risultano antigenicamente affini a quelli classici, ma marcatamente più virulenti (Etteradossi & Saif, 2020). Al giorno d'oggi, tuttavia, questa classificazione appare sempre più obsoleta e inadeguata a descrivere in modo esaustivo la crescente variabilità esistente tra i diversi ceppi di IBDV (Jackwood et al., 2018). Essa risulta inoltre di difficile applicazione per via dell'ampio ricorso, nell'ambito della diagnosi routinaria di IBD, a metodiche di biologia molecolare, che non permettono una valutazione diretta né della patogenicità né dell'antigenicità. Ciò ha portato alla necessità di dotarsi di sistemi di classificazione più standardizzati e basati sulla filogenesi. Al momento ne sono disponibili tre: il primo, proposto da Michel & Jackwood (2017), prende in considerazione una porzione del gene della VP2, dividendo il sierotipo 1 in 7 diversi genogruppi. I rimanenti due schemi di classificazione, proposti da Islam et al. (2021) e Wang et al. (2021), considerano anche una parte del gene della VP1, permettendo l'identificazione di eventi di riassortimento e riconoscendo, con ottima ma non completa sovrapposizione, 9 genogruppi a livello di segmento A e 5 a livello di segmento B. Combinando le due classificazioni in genogruppi, si ottiene inoltre una classificazione composita in genotipi. Successivamente alla proposta di questi tre sistemi di classificazione, un nuovo gruppo di ceppi di IBDV con peculiarità uniche a livello di gene della VP2 è stato identificato in Portogallo (Legnardi et al., 2022), aumentando quindi il computo totale di genogruppi/genotipi.

Per via dell'elevata contagiosità e resistenza a livello ambientale di IBDV, il controllo della malattia non può prescindere da rigorose pratiche di biosicurezza e

dall'applicazione della vaccinazione. Le strategie vaccinali ad oggi disponibili includono un'ampia gamma di vaccini vivi attenuati, basati su ceppi a diversa virulenza residua, vaccini vettorizzati e ad immunocomplessi, i quali possono differire per vie e tempistiche di somministrazione (Muniz et al., 2018). Indipendentemente dalla strategia adottata, il controllo di IBDV dovrebbe comunque prevedere l'allestimento di un solido sistema di monitoraggio che consenta di identificare, caratterizzare e combattere efficacemente eventuali minacce epidemiologiche. Coerentemente con questi principi, questo studio si pone come obiettivo quello di fornire, utilizzando gli strumenti offerti dai moderni sistemi di classificazione, un aggiornamento epidemiologico sulla situazione di IBDV in Europa occidentale.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il presente studio è basato sui risultati delle attività di diagnostica molecolare svolte nel corso del 2021 dal laboratorio di microbiologia e malattie infettive del dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università di Padova. In particolare, sono stati presi in considerazione tutti i campioni ricevuti da paesi dell'Europa occidentale per la ricerca di IBDV tramite indagini molecolari, conferiti in forma di *pool* di 4-10 borse di Fabrizio tal quali o impresse su FTA^o card.

Processazione dei campioni ed estrazione dell'RNA virale

I *pool* conferiti su FTA^o card sono stati processati tagliando frammenti di ugual dimensione per ognuno dei singoli campioni e trasferendoli in un'unica provetta da 2 mL. Dopo l'aggiunta di 1.5 mL di soluzione PBS 1x, i campioni sono stati vortexati per 30 sec. I *pool* di borse tal quali sono invece stati uniti in una provetta Falcon da 50 mL contenente 10 mL di soluzione PBS 1x e vortexati per 30 sec. Gli acidi nucleici sono stati estratti da 200 mL di ciascun eluato usando il kit *High Pure Viral Nucleic Acids* (Roche^o) secondo le istruzioni del produttore. Sia gli eluati che gli estratti sono stati conservati a -80°C per archivio e ulteriori analisi.

Analisi molecolari

Una porzione del gene della VP2 è stata amplificata tramite RT-PCR *one-step*, impiegando i *primer* 743-1 (5' -GCCCAGAGTCTACACCAT-3') e 743-2 (5'-CC-CGGATTATGTCTTTGA-3') (Jackwood & Sommer-Wagner, 2005). In caso di risultato positivo, si è proceduto con il sequenziamento con metodo Sanger, eseguito con entrambi i *primer*. Successivamente, i campioni in cui venivano identificati ceppi di campo, classificati come tali sulla base della distanza genetica da ceppi vaccinali di referenza, sono stati sottoposti a ulteriori indagini per caratterizzare una parte del gene della VP1 utilizzando due RT-PCR sovrapposte, basate sulle coppie di *primer* B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTATGAGACCGA-3')/B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') (Islam et al., 2011) e 66 (5'-ATC-CTTGACGGCACCCTT-3')/67 (5'-CCCGGATTATGTCTTTGA-3') (Ruud et al., 2002). Tutte le RT-PCR sono state eseguite con il kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™).

Analisi filogenetiche

I cromatogrammi ottenuti tramite sequenziamento Sanger sono stati valutati visivamente e sottoposti a *trimming* usando 4peaks (Nucleobytes B.V.), per poi essere assemblati in sequenze consenso con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd). La classificazione è stata condotta su base filogenetica basandosi sui criteri proposti da Islam et al. (2021). A tal scopo, due dataset, uno per il gene della VP2 e l'altro per quello della VP1, comprendenti i ceppi sequenziati assieme a sequenze di referenza reperite da GenBank, sono stati allineati con metodo MUSCLE (Edgar et al., 2004) e trimmati ad una lunghezza standard. I rispettivi alberi filogenetici sono stati quindi costruiti in Mega X (Kumar et al., 2018) con metodo *Maximum Likelihood* (1000 *bootstrap*) e scegliendo il modello di sostituzione più appropriato sulla base del valore di *Bayesian information criterion* (BIC) calcolato con jModelTest (Darriba et al., 2012). Solo i ceppi per cui erano disponibili porzioni di entrambi i segmenti sono stati inclusi nei dataset definitivi.

Ulteriori analisi sono state condotte per *clade* di ceppi di campo ritenuti rilevanti. Dopo aver individuato i ceppi di interesse, le 250 sequenze a maggior omologia a livello sia di VP2 che di VP1 sono state ottenute da GenBank e allineate al relativo subset, per poi condurre indagini filogenetiche esplorative. Gli alberi costruiti sulla base dei due segmenti sono stati quindi comparati per determinare che entrambi i segmenti di un dato ceppo (se disponibili) ricadessero nella rispettiva *clade* di interesse.

RISULTATI

Campionamento

Nel corso del 2021 sono stati conferiti 470 campioni da 9 paesi dell'Europa occidentale. In particolare, 15 campioni provenivano dal Belgio, 6 dalla Danimarca, 133 dalla Francia, 38 dalla Germania, 37 dall'Italia, 17 dai Paesi Bassi, 76 dal Portogallo, 128 dal Regno Unito (Inghilterra e Irlanda del Nord) e 20 dalla Spagna. Informazioni relative alla categoria produttiva sono state ottenute per 464 campioni, di cui 414 (89,2%) erano stati prelevati da gruppi di broiler, 49 (10,6%) da ovaiole e un solo campione (0,2%) da riproduttori. Il protocollo vaccinale era invece noto per 420 campioni, di cui 216 (51,4%) provenivano da animali vaccinati con uno o più vaccini vivi, mentre i vaccini vettorizzati e ad immunocomplessi erano stati somministrati rispettivamente in 56 (13,3%) e 148 (35,3%) gruppi di animali.

Analisi molecolari e filogenetiche

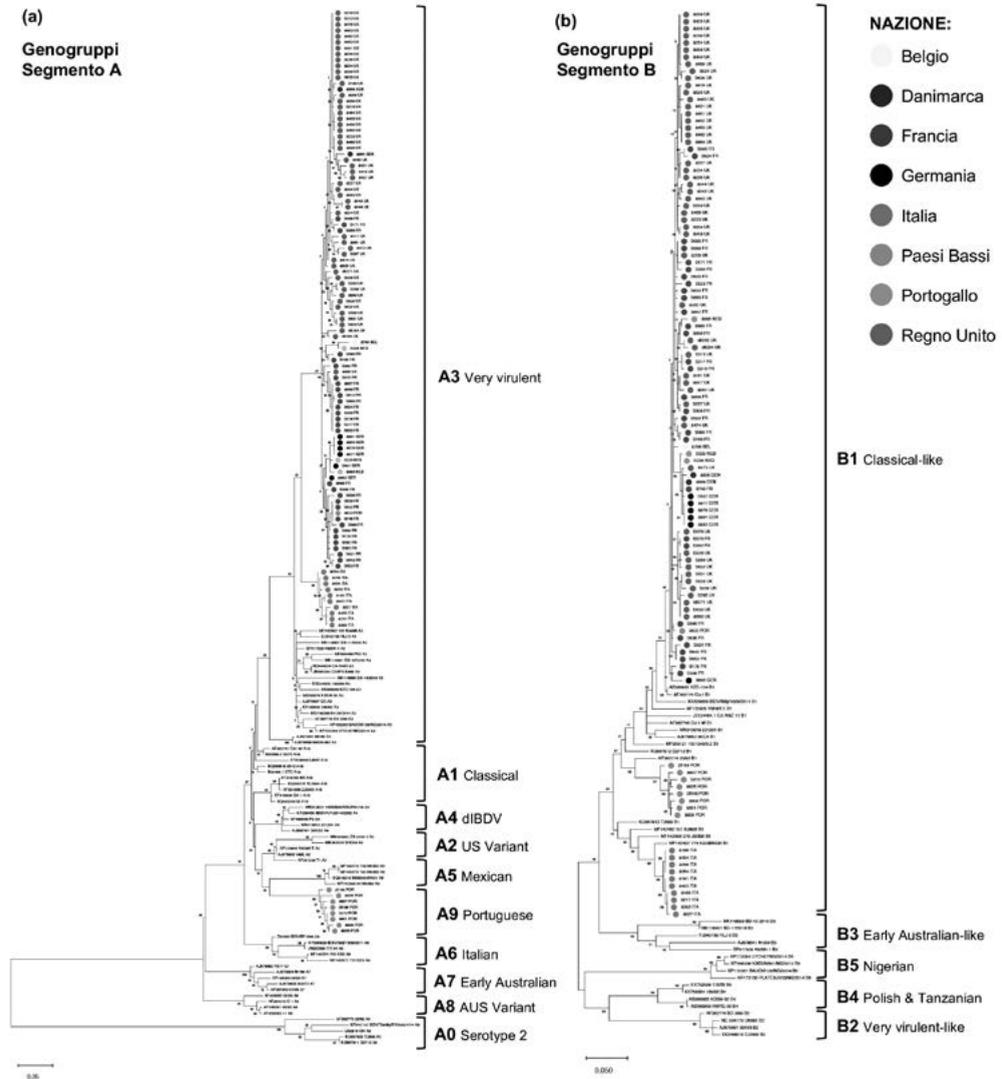
Le indagini molecolari aventi come target una porzione del gene della VP2 hanno evidenziato 393 (83,6%) positività a fronte di 77 campioni (16,4%) negativi. Sequenze di adeguata qualità sono state ottenute per 386 campioni: 243 di esse si sono dimostrate appartenere al genogruppo A1 (*Classical*) e la loro origine è stata caratterizzata come vaccinale; 11 sequenze, anch'esse considerate vaccinali (*V877-like*), sono ricadute all'interno del genogruppo A7 (*Early Australian*); 117 sequenze appartenevano al genogruppo A3 (*Very virulent*) e 15 al genogruppo A9 (*Portuguese*). I risultati completi sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Risultati delle indagini diagnostiche basate sul sequenziamento di parte del gene della VP2.

Paese	Positivi	Ceppi vaccinali		Ceppi di campo		Positivi non sequenziabili	Negativi
		Genogrupo A1	Genogrupo A7	Genogrupo A3	Genogrupo A9		
Belgio	15	7	-	2	-	1	5
Danimarca	6	4	-	2	-	-	-
Francia	133	65	3	36	-	5	24
Germania	38	20	6	6	-	-	6
Italia	37	18	-	11	-	-	8
Paesi Bassi	17	8	-	4	-	-	5
Portogallo	76	36	1	3	15	-	21
Spagna	20	17	-	-	-	-	3
Regno Unito	128	68	1	53	-	1	5
Totale	470	243 (51,7%)	11 (2,3%)	117 (24,9%)	15 (3,2%)	7 (1,5%)	77 (16,4%)

Le 132 sequenze caratterizzate come A3 o A9 sono state considerate appartenenti a ceppi di campo e sottoposte a ulteriori analisi. Per 113 di questi ceppi è stato possibile ottenere le rispettive sequenze del gene della VP1, tutte ricadute all'interno del genogrupo B1 (*Classical-like*). A livello di genotipo, 105 ceppi sono stati quindi classificati come A3B1 e 8 come A9B1 (Figura 1). I ceppi A9B1 provenivano tutti da campioni portoghesi, ed erano caratterizzati da una elevata omologia, con un'identità genetica media pari al 98.9% e 98.6% rispettivamente a livello di VP1 e VP2. Al contrario, i ceppi A3B1 potevano essere divisi in due sottogruppi. Tutti i virus ritrovati in Belgio, Danimarca, Francia, Germania, Paesi Bassi e Regno Unito, oltre a un ceppo proveniente dal Portogallo, formavano un'unica *clade* caratterizzata da un'identità genetica media del 98,7% e 97,8% a livello di VP1 e VP2, mentre i ceppi italiani formavano un secondo e ben definito cluster all'interno del medesimo genogrupo (99,6% e 99,2% di identità genetica a livello di geni della VP2 e VP1). Alcuni dei ceppi italiani e portoghesi erano già stati riportati in precedenti lavori (Legnardi et al., 2021, 2022).

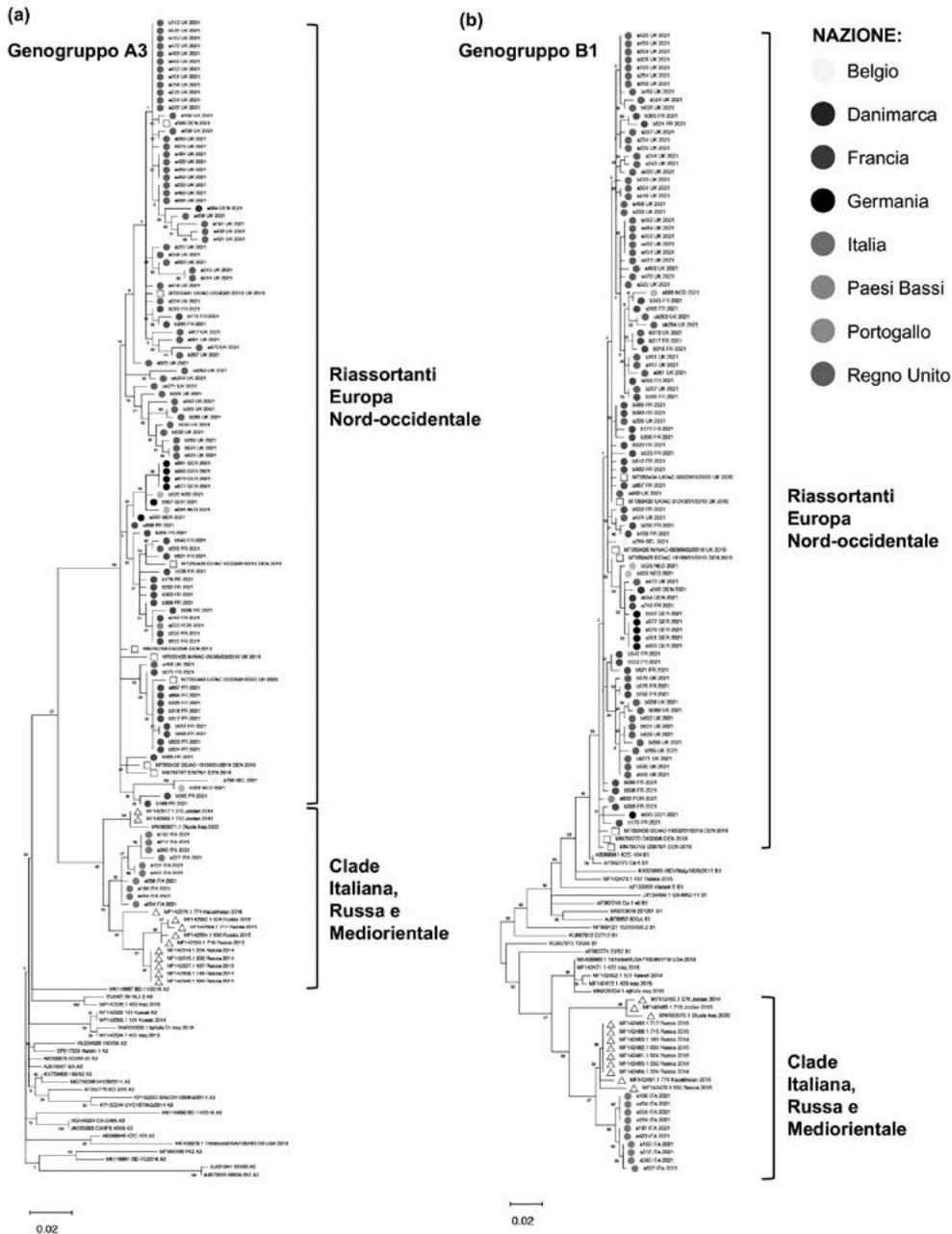
Figura 1. Classificazione filogenetica a livello di segmento A (a) e B (b) dei ceppi ritrovati nel presente studio, colorati in base al paese di ritrovamento. Gli alberi filogenetici sono stati inferiti con metodo *Maximum Likelihood* (1000 repliche). Per il segmento A, il segmento genomico considerato era di 366 nucleotidi, mentre per il segmento B era di 431 nucleotidi. I modelli di sostituzione utilizzati sono stati rispettivamente GTR+G e GTR+I+G.



Le due *clade* appartenenti al genotipo A3B1 sono state selezionate per ulteriori approfondimenti. Ciò ha portato all'identificazione, tramite ricerche effettuate in GenBank, di 12 ceppi caratterizzati da elevata omologia con i virus ritrovati in Italia, la cui presenza è stata riportata in Russia, Giordania, Kazakistan e Iraq tra il 2014 e il 2020 (Michel & Jackwood, 2017). Altri ceppi con analoghe caratteristiche a livello di VP1, ma con significative differenze nella VP2, sono stati invece segnalati in Kuwait, Iraq e gli Stati Uniti (Abbas et al., 2021; Michel & Jackwood, 2017; Michel et al., 2019) (Figura 2).

Per quanto riguarda i ceppi A3B1 ritrovati nel resto d'Europa, essi si sono dimostrati geneticamente affini a 7 virus identificati tra il 2018 e il 2020 in Danimarca e Regno Unito (Mató et al., 2020) (Figura 2). Questi ceppi risultavano caratterizzati come riassortanti aventi una VP2 *very virulent-like* e una VP1 ereditata da un ceppo classico attenuato di probabile origine vaccinale (Mató et al., 2020). Svareti altri ceppi olandesi, cechi, svedesi, belgi e tedeschi, sequenziati da Mató et al. (2020) e Van Borm et al. (2021) presentavano una elevata identità genetica a livello di gene della VP2, ma sono stati esclusi dall'analisi per via della mancata sovrapposizione delle rispettive sequenze del gene della VP1 al segmento considerato per la classificazione.

Figura 2. Alberi filogenetici dei genogruppi A3 (a) e B1 (b). Le sequenze reperite da GenBank, caratterizzate da elevata identità con la *clade* italiana sono identificate con un triangolo (Δ), mentre quelle omologhe a riassortanti dell'Europa Nord-Occidentale con un quadrato (\square). Gli alberi filogenetici sono stati inferiti con metodo *Maximum Likelihood* (1000 replicati) e utilizzando il modello di sostituzione GTR+G.



DISCUSSIONE

Per quanto la convenienza del campionamento prevenga rigorose stime sulla prevalenza, il frequente ritrovamento di ceppi di campo in otto paesi dell'Europa occidentale sui nove indagati, con la sola eccezione della Spagna, suggerisce un'imponente circolazione di IBDV nella regione considerata nell'arco del 2021. Comparando i risultati qui riportati con quelli di uno studio epidemiologico svolto con finalità e metodiche analoghe nel 2013 da De Wit et al. (2018), si scopre che il numero relativo di ceppi di campo ritrovati è passato in meno di 10 anni dal 3% (6 positività ascrivibili a ceppi di campo su un totale di 199 campioni) all'attuale 28% (132 positività su 470 campioni). La rilevanza sanitaria ed economica di questo apparentemente notevole aumento della pressione infettiva appare tuttavia di difficile determinazione. Da una parte, la grande maggioranza dei campioni risultava prelevata per finalità di monitoraggio routinario e in assenza di segni clinici. Dall'altra, è necessario considerare che molti dei genotipi di IBDV ad oggi circolanti appaiono associati a infezioni subcliniche, risultando quindi di più difficile rilevazione rispetto a ceppi più virulenti. Questo sembra essere vero *in primis* per i ceppi appartenenti al genotipo A3B1 ritrovati nella quasi totalità dei paesi considerati, rivelatisi geneticamente affini a virus riassortanti segnalati in Europa nord-occidentale a partire dal 2017 (Mató et al., 2020). Sulla base di prove di patogenicità svolte *in vivo*, questa tipologia di virus, apparentemente originati da un evento di ricombinazione tra un ceppo *very virulent* e un ceppo classico attenuato, si è dimostrata per l'appunto associata a infezioni subcliniche. Ciononostante, il rilevamento di una marcata atrofia della borsa di Fabrizio sembra suggerire una forte capacità immunosoppressiva (Mató et al., 2020). La rapida diffusione di questi riassortanti, documentata dai risultati ottenuti in questo studio, è tale da destare notevole preoccupazione, ma essi non rappresentano l'unica minaccia epidemiologica per la regione. La totalità dei ceppi A3B1 ritrovati in Italia è risultata infatti appartenente a una *clade* distinta e filogeneticamente vicina a ceppi russi, kazaki e mediorientali. Come già riportato da Legnardi et al. (2021), la circolazione di questi ceppi sul suolo italiano non sembra essere una novità, in quanto virus con caratteristiche genetiche e aminoacidiche compatibili, anche se originariamente considerati stipiti *very virulent*, sono stati identificati in molteplici studi svolti nell'ultimo decennio (Lupini et al., 2016; De Wit et al., 2018; Gambi et al., 2020). Un simile discorso vale anche per i virus di campo ritrovati in Portogallo, dimostratisi appartenere al genotipo A9B1. Nonostante la caratterizzazione di questo genotipo sia estremamente recente (Legnardi et al., 2022), ceppi con analoghe caratteristiche sono stati segnalati in Spagna nel 2009 e in Portogallo nel 2013 (De Wit et al., 2018; Legnardi et al., 2022), suggerendo una circolazione protratta nel tempo e probabilmente sottodiagnosticata. Ciò non fa che avvalorare l'utilità dei sistemi di classificazione filogenetici proposti tra l'esecuzione degli studi sopraccitati e il presente lavoro, i quali hanno permesso una caratterizzazione più completa e standardizzata dei ceppi identificati. D'altra parte, le analisi virologiche e sierologiche appaiono ancora necessarie per una piena comprensione della patobiologia di IBDV, e quindi del suo reale impatto clinico ed economico.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano una significativa circolazione di ceppi IBDV di campo in Europa occidentale, in particolare di virus riassortanti con una VP2 *very virulent-like* e una VP1 *classical-like*, già segnalati in diversi paesi europei e associati a infezioni subcliniche (Mató et al., 2020). Nel presente studio, questi ceppi sono stati individuati in gran numero e in un areale ancora più esteso, dimostrando come essi rappresentino attualmente la tipologia di ceppi di campo di maggior rilevanza per la regione. In aggiunta, un genotipo di recente caratterizzazione è stato dimostrato circolare localmente in Portogallo, mentre in Italia sono stati identificati ceppi sinora riportati solo in Russia, Kazakistan e Medio Oriente. Questi dati potranno risultare utili per una miglior comprensione dell'epidemiologia e dell'evoluzione di IBDV in Europa, e conseguentemente per una pianificazione informata delle strategie di controllo.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AH, Al Saegh HA and FS ALaraji. (2021). Sequence diversity and evolution of infectious bursal disease virus in Iraq. *F1000Research*, 16: 293.
2. Alkie TN and S Rautenschlein. (2016). Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, 19: 9-18.
3. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA and VN Vakharia. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 75: 11974–11982.
4. Chen G, He X, Yang L and P Wei. (2018). Antigenicity characterization of four representative natural reassortment IB DVs isolated from commercial three-yellow chickens from Southern China reveals different subtypes co-prevalent in the field. *Vet. Microbiol.* 219: 183-189.
5. De Wit JJ, Cazaban C, Dijkman R, Ramon G and Y Gardin. (2018). Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease virus in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian Pathol.* 47:140-151.
6. Darriba D, Taboada GL, Doallo R and D Posada. (2012). Jmodeltest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Met.* 9: 772.
7. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004). *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.
8. Escaffre O, Le Nouen C, Amelot M, Ambroggio X, Ogden KM, Guionie O, Toquin D, Müller H, Islam MR and N Etteradossi. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, 87: 2767–2780.
9. Etteradossi N and YM Saif. (2020). Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, Wiley-Blackwell, pp. 257-283.
10. Gambi L, Berto G, Fiorentini L, Koutoulis K, Barbieri I, Massi P and G Tosi. (2020). Studio della circolazione del virus della bursite infettiva negli allevamenti di pollastre della linea ovaioia da consumo nel periodo maggio-settembre 2019. In *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2020. LIX Convegno Annuale & V Simposio Scientifico* (p. 119). Bologna, Italia.
11. He X, Chen G, Yang L, Xuan J, Long H and P Wei. (2016). Role of naturally

- occurring genome segment reassortment in the pathogenicity of IBDV field isolates in Three-Yellow chickens. *Avian Pathol.* 45: 178-186.
12. Islam MR, Rahman S, Noor M, Chowdhury EH and H Muller (2011). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Arch. Virol.* 157: 333-336.
 13. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Etteradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathol.* 50: 190-206.
 14. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease birnavirus (IBDV). *Virol.* 409: 33–37.
 15. Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO and JJ de Wit. (2018). A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathol.* 47: 576-584.
 16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA x: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
 17. Legnardi M, Tonellato FR, Cioffi A, Tucciarone CM, Franzo G, Garavini G, Trevisani G, Dall’Angelo A and M Cecchinato. (2021). Caratterizzazione molecolare di ceppi riassortanti del virus della bursite infettiva (IBDV) circolanti in Italia. In *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2021. LX Convegno Annuale & VI Simposio Scientifico* (p. 101). Bologna, Italia.
 18. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Duarte I, Silva M, Le Tallec B and M Cecchinato. (2022). Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathol.* 51: 97-105.
 19. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M and E Catelli. (2016). A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.* 45: 458-464.
 20. Maraver A, Ona A, Abaitua F, Gonzalez D, Clemente R, Ruiz-Diaz JA, Castan JR, Pazos F and JF Rodriguez. (2003). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J. Virol.* 77: 6438–6449.
 21. Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K and V Palya. (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Vet. Microbiol.* 245: 108663.
 22. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch. Virol.* 162: 3661-3670.
 23. Michel LO, Kimber ML and DJ Jackwood. (2019). New introduction of a very virulent infectious bursal disease virus in New York, USA. *Avian Pathol.* 48: 486-491.
 24. Muniz EC, Verdi R, Jackwood DJ, Kuchpel D, Resende MS, Mattos JCQ and K Cookson. (2018). Molecular epidemiologic survey of infectious bursal disease viruses in broiler farms raised under different vaccination programs. *J.*

- Appl. Poult. Res.* 27: 253-261.
25. Rudd MF, Heine HG, Sapats SI, Parede L and J Ignjatovic. (2002). Characterisation of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 147: 1303-1322.
 26. Van Borm S, Steensels M, Mathijs E, Vandenbussche F, van den Berg T and B Lambrecht. (2021). Metagenomic sequencing determines complete infectious bronchitis virus (avian Gammacoronavirus) vaccine strain genomes and associated viromes in chicken clinical samples. *Virus Genes* 57: 529-540.
 27. Wang Y, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X and X Qi. (2021). An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification based on both genome-segments A and B. *J. Integr. Agric.* 20: 1372-1381.

VACCINI O CEPPLO DI CAMPO? LEZIONI DALLA VARIANTE 2

Franzo G.¹, Tucciarone C.M.¹, Homonnay Z.², Dauphin G.³, Koutoulis K.C.⁴, Cecchinato M.¹, Legnardi M.¹

¹*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università di Padova, Legnaro, Italia*

²*Ceva Phylaxia, Szállás u. 5., 1107 Budapest, Ungheria*

³*Ceva Santé animale, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France*

⁴*Dipartimento di Malattie Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università della Tessaglia, 43100 Karditsa, Grecia*

Summary

The control of infectious bronchitis (IB), one of the most impactful viral diseases of poultry, is largely based on routine vaccine administration. Despite their efficacy, the vast reliance on live-attenuated vaccines implies significant risks due to their capability to replicate and be transmitted among animals and farms. The detection of strains genetically related to vaccines complicates the diagnostic process and understanding of the viral molecular epidemiology. Moreover, reversion to virulence and associated clinical outbreaks can also occur.

In the present study, three vaccine vials, based on IBV lineage GI-23 (also known as Variant2) were deep sequenced through Next Generation Sequencing (NGS) to investigate the presence and features of viral subpopulations. To investigate the implications for the field and identify potential markers suitable for a DIVA strategy, the S1 sequences of strains originating from farms in different countries were sequenced and classified based on the knowledge of their vaccination history and comparison with the sequence of the applied vaccine. Although all considered vaccine batches shared the same consensus sequence, different subpopulations were identified suggesting independent and poorly constrained evolutionary processes. The vaccine consensus sequences and the respective subpopulations clustered with vaccine strains sampled from farms and no genetic features were consistently shared with field strains. Therefore, the vaccine-induced outbreaks more likely originate from *in vivo* evolution rather than selection of already present subpopulations. Although some amino acid residues were more commonly detected in either field or vaccine strains, no consistent marker could be identified.

This evidence, coupled with the occurrence of subpopulations within IBV GI-23-based vaccines and the variability among different production batches herein demonstrated makes the differentiation between field and vaccine-derived strains extremely challenging, based on sequence analysis alone. The knowledge of farm management and vaccination history should thus be considered for a proper epidemiological investigation.

INTRODUZIONE

L'uso della vaccinazione ha rappresentato una delle maggiori scoperte nella storia della medicina ed è uno strumento fondamentale per il controllo delle malattie, incluse quelle emergenti, di interesse umano e veterinario. Nel corso del tempo nuove tecniche di sviluppo e somministrazione dei vaccini hanno permesso di massimizzarne l'efficacia e la facilità d'uso, minimizzando allo stesso tempo gli effetti collaterali [1]. Tuttavia, alcuni

approcci tradizionali, come l'uso di virus attenuati, sono tuttora largamente applicati specialmente in medicina veterinaria, dove fattori economici e pratici giocano un ruolo di primaria importanza. Il virus della bronchite infettiva (IBV) è un ottimo esempio in tal senso, poiché la vaccinazione rappresenta un presidio fondamentale per il controllo della malattia da esso causata ed è quindi ampiamente utilizzato a livello mondiale. In particolare, i vaccini vivi attenuati sono quelli maggiormente applicati, in quanto garantiscono lo sviluppo di una forte immunità locale, umorale e cellulare, quantomeno nei confronti di ceppi geneticamente simili al vaccino. Inoltre, il loro sviluppo è relativamente semplice, il che permette di aggiornarli e introdurne di nuovi al variare dello scenario epidemiologico, fatto particolarmente frequente in funzione dell'elevato tasso evolutivo di IBV. Infine, la capacità di replicare ne permette una più agevole somministrazione in condizioni di campo, in incubatoio o in allevamento [2, 3]. L'escrezione del virus vaccinale può anche contribuire a migliorare il *coverage* complessivo in popolazioni vaccinate in modo sub-ottimale. D'altra parte, questi vantaggi comportano degli inevitabili effetti collaterali. L'attenuazione implica la selezione di varianti caratterizzate da una minor virulenza. Tuttavia, i virus a singolo filamento di RNA come IBV sono caratterizzati da un elevato tasso di mutazioni, indicativamente una mutazione ad ogni replicazione del genoma virale [4]. Non sorprende quindi che diverse varianti possano emergere sia *in vivo* che *in vitro*, come già dimostrato in precedenza anche nel caso di vaccini vivi attenuati [5]. Ne consegue che il processo di attenuazione sia spesso scarsamente prevedibile e controllabile e che alcune sottopopolazioni virali con una virulenza residuale potrebbero mantenersi, venendo poi selezionate durante la replicazione negli animali. Inoltre, anche in assenza di questo fenomeno, non vi è alcuna garanzia nei confronti di fenomeni di reversione a virulenza, in particolare qualora si instaurino "*rolling reactions*" in popolazioni animali solo parzialmente vaccinate. Entrambi questi fenomeni potrebbero esitare nell'emergere di focolai di malattia indotta dal vaccino. La capacità del virus di replicare e diffondere fra gli animali e gli allevamenti ha anche importanti implicazioni dal punto di vista epidemiologico. Il riscontro di sequenze "simil-vaccino" in episodi di malattia può essere riconducibile a diverse cause: 1) riscontro accidentale del vaccino in presenza di altre cause di malattia, 2) coinfezione del vaccino con il ceppo di IBV di campo, nei confronti del quale la protezione è spesso parziale, 3) somiglianza casuale fra ceppi di campo e vaccinale, 4) reversione a virulenza del vaccino o selezione di sottopopolazioni vaccinali con diversa virulenza. È chiaro che ciascuno di questi scenari ha importanti ricadute pratiche sulla gestione dell'allevamento e sullo sviluppo e somministrazione dei vaccini. Sfortunatamente, la discriminazione fra ceppi di campo e vaccinali rappresenta ad oggi un problema largamente irrisolto. La recente espansione della Variante2 (lineage GI-23) in diversi paesi africani, asiatici, europei e più recentemente americani, ha determinato l'introduzione del vaccino omologo in molti stati [6, 7]. Questa scelta, a prescindere dai benefici pratici, ha ostacolato lo studio della reale presenza e prevalenza del ceppo di campo, nonché la stima delle conseguenze cliniche ed economiche. La routinaria attività diagnostica si focalizza tipicamente sul sequenziamento di parte del gene S1, regione determinante per il tropismo, la virulenza e l'immunogenicità del virus. Questo gene si caratterizza inoltre per una maggiore variabilità genetica che permette una migliore risoluzione nella caratterizzazione dei ceppi [8]. Nonostante ciò, sovente anche questa regione risulta inadeguata per la discriminazione fra ceppi vaccinali e di campo, non essendo stati definiti dei chiari *cut-off* [9]. In presenza di un numero limitato di mutazioni, diverse spiegazioni possono

essere chiamate in causa: errori nel sequenziamento, evoluzione del vaccino in campo, selezione di sottopopolazioni vaccinali preesistenti, riscontro di ceppi di campo simili al vaccino, ecc. Sulla base di quanto detto, due tematiche appaiono particolarmente pressanti per i medici veterinari: la differenziazione fra ceppi di campo e vaccinali e la comprensione se il riscontro di ceppi di origine vaccinale in presenza di segni clinici sia riconducibile a forme di reversione a virulenza o rappresenti un riscontro incidentale. L'identificazione di sottopopolazioni vaccinali e la loro caratterizzazione può essere di grande utilità per capire se alcune di queste siano più prone alla replicazione *in vivo* e possano emergere quindi come agenti di *outbreak* clinici. Inoltre, il confronto con sequenze ottenute in campo potrebbe contribuire alla comprensione dell'impatto della variabilità intra-vaccino nel complicarne la differenziazione rispetto ai ceppi di campo e potenzialmente alla definizione di mutazioni marker. A tal fine, tre lotti di vaccino basato su Variante2 sono stati sequenziati tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) per valutare la presenza e struttura di sottopopolazioni virali. Inoltre, le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle ottenute da ceppi campionati in diversi allevamenti europei, per i quali lo status vaccinale fosse noto.

MATERIALI E METODI

Sequenziamento dei ceppi vaccinali

Tre boccette di vaccino basato su Variante2, appartenenti a lotti differenti (ID: 20381107A, 20381076B and 20381115B) sono state selezionate e ricostituite in acqua ultrapura per biologia molecolare. L'RNA è stato estratto a partire da 200µL della soluzione ottenuta usando il kit *High Pure RNA Isolation* (Roche, Basilea, Svizzera). I campioni sono stati sottoposti a NGS utilizzando la piattaforma NovaSeq6000 dopo aver preparato le apposite librerie con il kit *TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Pre*.

Analisi dei dati NGS

Le *read* ottenute sono state analizzate al fine di eliminare artefatti legati alla procedura di sequenziamento e filtrare le sequenze di scarsa qualità. Inizialmente le *read* di ciascuna *vial* vaccinale sono state allineate ad un genoma di referenza (*re-sequencing*) di Variante2, ottenendo così la rispettiva sequenza consenso, che è stata successivamente utilizzata per un secondo *round* di allineamento. Considerata la rilevanza in termini diagnostici, le analisi si sono focalizzate sulla regione S1, la cui variabilità è stata valutata in termini di presenza e frequenza di *Single nucleotide variation* (SNV) utilizzando LoFreq [10]. L'intero aplotipo (i.e. la sequenza della specifica sottopopolazione) è stato inoltre ricostruito e la sua frequenza stimata utilizzando il software Claque [11].

Caratterizzazione dei ceppi di campo

Ottantatré campioni di archivio derivanti da diversi stati d'Europa, precedentemente caratterizzati come Variante2 sulla base del sequenziamento della terza regione iper-variabile e per i quali fosse nota l'anamnesi vaccinale, sono stati selezionati per il sequenziamento dell'intera regione S1 con metodo Sanger. Dopo valutazione della qualità delle sequenze, queste sono state allineate fra loro e con la sequenza consenso e le sottopopolazioni del vaccino. Le sequenze campionate in allevamento sono state infine classificate come "di campo" o "vaccinali" sulla base della percentuale dell'identità nucleotidica rispetto ai ceppi vaccinali applicati e della conoscenza dell'anamnesi vaccinale dell'allevamento. Dopo traduzione delle sequenze nucleotidiche in aminoacidi è

stata valutata la presenza di *marker* che permettessero una consistente differenziazione nelle due tipologie.

Analisi filogenetica

Sulla base della regione S1, sono stati ricostruiti degli alberi filogenetici utilizzando il metodo di Massima Verosimiglianza implementato in IQ-Tree [12]. A tal fine è stato utilizzato sia l'allineamento nucleotidico che aminoacidico. Sono stati anche ricostruiti dei network di aplotipi utilizzando l'algoritmo *minimum spanning tree*, implementato nella libreria *pegas* di R [13].

RISULTATI

Ricostruzione delle SNV e degli aplotipi vaccinali tramite NGS

La sequenza consenso della regione S1 è risultata essere identica fra i tre lotti vaccinali. In ciascuno di questi però si sono evidenziate diverse SNV, rispettivamente 11, 25 e 15 nei lotti 20381076B, 20381107A e 20381115B. Le SNV differivano sia per localizzazione che per frequenza fra i diversi lotti, con l'eccezione di quattro posizioni variabili condivise (i.e. nt 50, 364, 1172 e 1280) dai tre vaccini. Due ulteriori siti (i.e. 126 e 554) sono risultati variabili in due dei tre lotti (Figura 1).

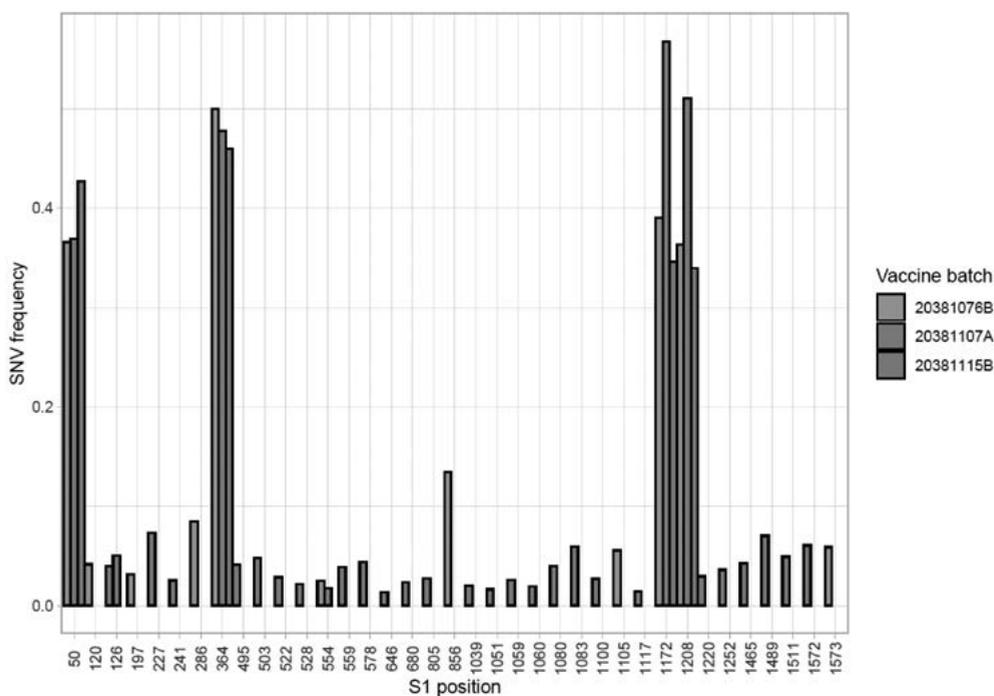


Figura 1. Grafico a barre rappresentante la frequenza dei nucleotidi alternativi rispetto a quelli caratterizzanti la sequenza di riferimento. Solamente le posizioni dell'S1 ove sono state identificate SNV sono state riportate. I diversi lotti vaccinali sono codificati da diversi colori.

La ricostruzione degli aplotipi ha confermato l'identità della sequenza consenso dei diversi lotti, sebbene ciascuno di questi presentasse degli aplotipi minori caratteristici. Degno di nota è stato il riscontro di tre aplotipi che, pur presenti in lotti vaccinali diversi, erano geneticamente simili (Figura 2). In tutti i casi, con una sola eccezione, la variabilità nucleotidica riscontrata determinava delle mutazioni non-sinonimo rispetto al consenso.

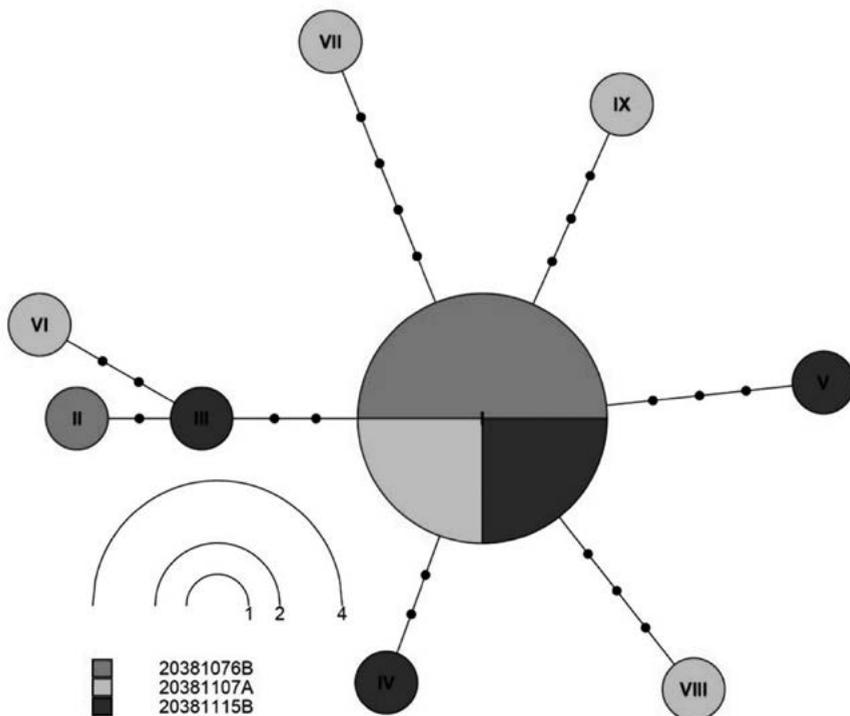


Figura 2. Network degli aplotipi ricostruiti per ciascun lotto vaccinale (codificati con diversi colori). Sequenze identiche sono rappresentate da cerchi il cui diametro è proporzionale alla frequenza della rispettiva sottopopolazione. Il numero di mutazioni è descritto da cerchi neri sui corrispettivi rami.

Analisi dei ceppi di campionati in allevamento.

La sequenza completa nella regione S1 è stata ottenuta da 67 ceppi di campo, dei quali era nota l'anamnesi vaccinale. Combinando quest'informazione, l'analisi filogenetica e il confronto dell'identità di sequenza con le referenze vaccinali, gli aplotipi sono stati classificati in "ceppi di campo" (n=38) e "ceppi di origine vaccinale" (n=29). Tre campioni sono stati classificati come ceppi di campo nonostante originassero da animali vaccinati in funzione dell'elevata distanza genetica (i.e. $p\text{-distance} > 0.3\%$; $> 5\text{ mismatch}$). Al contrario, 15 campioni originati da allevamenti non vaccinati sono stati classificati come vaccini in quanto geneticamente fortemente legati alla referenza vaccinale. L'analisi filogenetica ha confermato la presenza di due gruppi principali, uno comprensivo dei ceppi vaccinali, l'altro di quelli di campo (Figura 3).

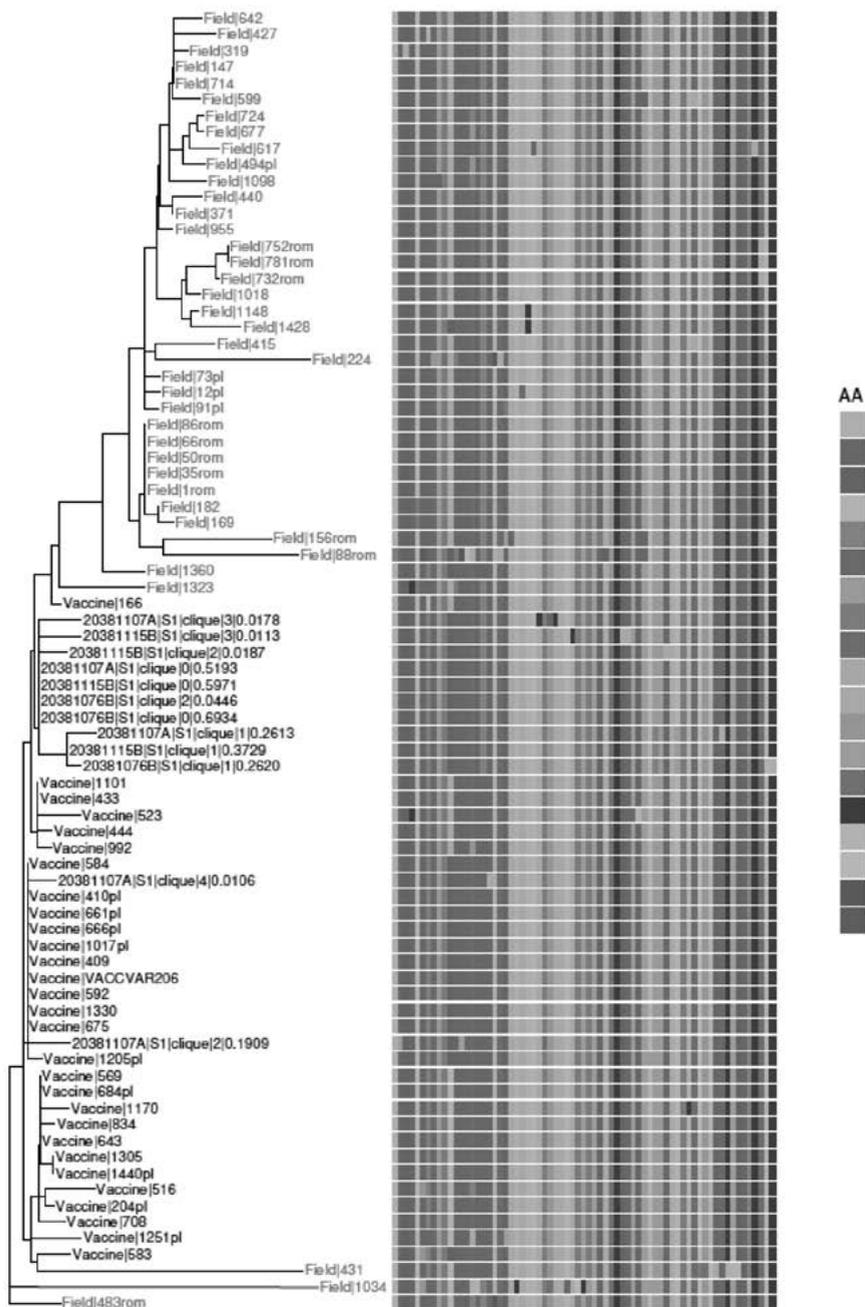


Figura 3. Grafico riportante le relazioni filogenetiche fra i ceppi campionati dagli allevamenti, le sequenze vaccinali consenso e le rispettive sottopolazioni. I ceppi di campo sono stati evidenziati in rosso. Il profilo aminoacidico delle posizioni variabili dell'S1 è riportato a destra di ciascun ceppo.

Sebbene nessuna posizione aminoacidica abbia permesso una sicura identificazione dei ceppi vaccinali, data la presenza di diverse eccezioni, alcuni residui hanno rivelato una diversa distribuzione nei ceppi vaccinali rispetto a quelli di campo (i.e. posizione 61, 93, 122 e 317) (Figura 3).

Nessuna delle sottopopolazioni identificate nei vaccini risultava geneticamente correlata né condivideva posizioni caratteristiche con i ceppi di campo, con una sola eccezione rappresentata dall'aminoacido 122 (Prolina), presente sia nella sequenza consenso che nella maggior parte degli aplotipi vaccinali minori. È interessante notare come il residuo in posizione 122 dei lotti ivi sequenziati differiva rispetto a quello presente nella sequenza del ceppo vaccinale caratterizzato in precedenza ed utilizzato come referenza.

DISCUSSIONE

Questo studio ha premesso di investigare la presenza e le caratteristiche di sottopopolazioni virali in diversi lotti vaccinali per studiarne le implicazioni pratiche. È stato quindi possibile confermare l'eterogeneità intra-vaccino e fra lotti vaccinali. Diverse posizioni della regione S1 hanno rivelato SNV, sebbene con diversa frequenza e localizzazione. Poiché ogni lotto è il risultato di un processo di attenuazione almeno parzialmente indipendente, l'assenza di pattern comuni supporta l'idea di un processo casuale (*genetic drift*) ascrivibile all'elevato tasso di mutazione di IBV, rispetto ad un'evoluzione direzionale frutto di specifici vincoli evolutivi. Similmente, il fatto che la maggior parte delle mutazioni fosse non sinonimo (un tipo di mutazioni solitamente rapidamente eliminate dalla selezione naturale in quanto deleterie per la fitness virale), suggerisce una tendenza "all'esplorazione" casuale di diverse soluzioni evolutive. Ciò detto, un numero limitato di SNV è risultato essere condiviso dalle sottopopolazioni di almeno due lotti. Inoltre, è stata identificata una clade filogenetica che includeva aplotipi presenti nei tre vaccini. Non è quindi possibile escludere la presenza di alcune pressioni che favoriscano una convergenza evolutiva in specifiche posizioni del genoma virale. In alternativa, la somiglianza evidenziata in queste posizioni potrebbe essere il residuo del processo di attenuazione del ceppo di campo. Sarebbe quindi di interesse comprendere se queste varianti presentino un vantaggio evolutivo durante la replicazione *in vivo*. Il confronto con le sequenze dei ceppi di campo sembra negare questa opportunità, data l'assenza di *clustering* di questi aplotipi con ceppi di campo e l'assenza di SNV condivise con quest'ultimi. Di conseguenza, anche ammettendo un effetto primario di ceppi di origine vaccinale nel determinare sintomatologia clinica, questo sarebbe più probabilmente ascrivibile a una progressiva reversione a virulenza in condizioni di campo, piuttosto che alla selezione di varianti più aggressive già presenti nel vaccino. Il confronto con ceppi campionati in allevamento ha inoltre permesso di evidenziare, qualora ve ne fosse ulteriormente bisogno, la difficoltà nella differenziazione di ceppi di campo e vaccini. Non è stato infatti possibile identificare alcun *marker* né a livello di sequenze consenso né di sottopopolazioni. Tuttavia, alcuni residui aminoacidici sono stati più comunemente riscontrati in una delle due categorie, il che permette, sebbene con una limitata confidenza, di propendere per l'una o l'altra, specialmente quando più residui forniscono una classificazione concordante. Data la presenza di molteplici eccezioni, qualsiasi responso deve essere interpretato con cautela e in modo critico. La conoscenza dello status vaccinale può sicuramente contribuire ad un responso più

accurato e andrebbe sicuramente considerato. Anche in questo caso però, un approccio critico è fondamentale, in quanto è ben noto come l'immunità indotta dal vaccino non sia sterilizzante e il *coverage* ottenuto sia spesso parziale. Ne consegue che il riscontro di ceppi di campo in popolazioni vaccinate non possa essere escluso. Similmente, è ben nota la capacità del virus vaccinale attenuato di replicare e diffondere anche fra allevamenti. Ciò permette facilmente di spiegare i risultati talvolta conflittuali fra storia vaccinale e caratterizzazione genetica dei ceppi, riscontrata anche nel presente studio. Un'ultima, fondamentale sfida è rappresentata dall'impossibilità di definire dei chiari *cut-off* di identità nucleotidica che possano supportare la classificazione dei ceppi. Anche nel presente studio, tale criterio è stato fissato sulla base di una *expert opinion*, e presenta quindi dei caratteri di arbitrarietà. Sebbene i lotti vaccinali considerati presentassero un'identica sequenza consenso e le sottopopolazioni non condividessero dei marker con i ceppi di campo, è interessante notare come un lotto più antico del vaccino, precedentemente sequenziato con metodo Sanger e utilizzato come riferimento, presentasse un differente aminoacido in posizione 122, condiviso da alcuni aplotipi minori degli attuali vaccini. L'aspetto più interessante è che i vaccini sequenziati nel presente studio dividevano, in questa posizione, lo stesso profilo aminoacidico dei ceppi di campo, mentre la sequenza vaccinale più antica differiva da questi ultimi e coincideva con i ceppi classificati come vaccini. Di conseguenza, è possibile speculare che una certa variabilità sia presente almeno fra lotti vaccinali prodotti a grande distanza di tempo, complicando ulteriormente la classificazione e l'interpretazione dello scenario epidemiologico. Ceppi di origine vaccinale potrebbero presentare motivi o distanze sistematicamente differenti dai ceppi di campo in funzione dello specifico lotto di produzione. Poiché i tentativi di classificazione al momento si basano proprio su soglie di distanze genetiche e/o posizioni *marker*, le conseguenze di questo fenomeno possono essere facilmente immaginate. Complessivamente, considerate tutte le fonti di incertezza, i risultati del presente studio sottolineano la necessità e superiorità di un'analisi razionale delle sequenze ottenute e dell'anamnesi di allevamento caso per caso, rispetto all'applicazione acritica di un qualsiasi algoritmo decisionale. Una conoscenza approfondita dello scenario epidemiologico, in particolare prima e dopo l'introduzione della vaccinazione, risulterebbe sicuramente di grande beneficio nell'interpretazione dei dati. Infine, la disponibilità delle sequenze del genoma completo dei ceppi vaccinali e dei loro progenitori, sia a livello di consenso che di sottopopolazioni, potrebbe contribuire all'identificazione dei reali marker di attenuazione vaccinale e quindi alla differenziazione degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Lombard M, Pastoret PP, and AM Moulin. (2007). A Brief History of Vaccines and Vaccination. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 26: 29–48.
2. Legnardi, M.; Tucciarone, C.; Franzo, G.; Cecchinato, M. (2020). Infectious Bronchitis Virus Evolution, Diagnosis and Control. *Vet. Sci.* 7. doi:10.3390/vet-sci7020079.
3. Franzo G, Swart W, Boyer W, Pasotto D, Ramon G, Koutoulis K and M Cecchinato. (2020). No Good Vaccination Quality without Good Control: The Positive Impact of a Hatchery Vaccination Service Program. *Poult. Sci.* 99: 2976–2982. doi:10.1016/j.psj.2020.03.017.

4. Duffy S. (2018). Why Are RNA Virus Mutation Rates so Damn High? *PLOS Biol.* 16: e3000003, doi:10.1371/journal.pbio.3000003.
5. Franzo G, Naylor CJ, Drigo M, Croville G, Ducatez MF, Catelli E, Laconi A and M Cecchinato. (2016). Evidence of Subpopulations in AMPV Vaccines Using NGS. (2016). In *Proceedings of the Proceedings of 9th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses – 4th Annual Meeting of the Cost Action FA1207 on controlling Avian Coronaviruses* (p. 194).
6. Houta MH, Hassan KE, El-Sawah AA, Elkady MF, Kilany WH, Ali A and AS Abdel-Moneim. (2021). The Emergence, Evolution and Spread of Infectious Bronchitis Virus Genotype GI-23. *Arch. Virol.* 166: 9–26.
7. Houta MH, Hassan KE, Legnardi M, Tucciarone CM, Abdel-Moneim AS, Cecchinato, M.; El-Sawah AA, Ali A and G Franzo. (2021). Phylodynamic and Recombination Analyses of Avian Infectious Bronchitis GI-23 Reveal a Widespread Recombinant Cluster and New Among-Countries Linkages. *Animals* 11. doi:10.3390/ANI11113182.
8. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G and I Monne. (2016). S1 Gene-Based Phylogeny of Infectious Bronchitis Virus: An Attempt to Harmonize Virus Classification. *Infect. Genet. Evol.* 39: 349–364, doi:10.1016/j.meegid.2016.02.015.
9. Legnardi M, Franzo G, Koutoulis KC, Wiśniewski M, Catelli E, Tucciarone CM and Cecchinato M. (2019). Vaccine or Field Strains: The Jigsaw Pattern of Infectious Bronchitis Virus Molecular Epidemiology in Poland. *Poult. Sci.* 98: 6388–6392, doi:10.3382/ps/pez473.
10. Wilm A, Aw PPK., Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, Khor CC, Petric R, Hibberd ML and N Nagarajan. (2012). LoFreq: A Sequence-Quality Aware, Ultra-Sensitive Variant Caller for Uncovering Cell-Population Heterogeneity from High-Throughput Sequencing Datasets. *Nucleic Acids Res.* 40: 11189–11201, doi:10.1093/nar/gks918.
11. Töpfer A, Marschall T, Bull RA, Luciani F, Schönhuth A and N Beerenwinkel. (2014). Viral Quasispecies Assembly via Maximal Clique Enumeration. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* 8394 LNBI: 309–310. doi:10.1007/978-3-319-05269-4_25.
12. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A and BQ Minh. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32: 268–274, doi:10.1093/molbev/msu300.
13. Paradis E. (2010). Pegas: An R Package for Population Genetics with an Integrated-Modular Approach. *Bioinformatics*, 26: 419–420, doi:10.1093/bioinformatics/btp696.

IMPIEGO DEL VACCINO RICOMBINANTE RN1250 PER IL CONTROLLO DELLA MALATTIA DI MAREK: CINETICA VACCINALE ED EFFICACIA IN RIPRODUTTORI PESANTI

Lupini C.¹, Quaglia G.¹, Benedetti V.², Mescolini G.¹, Prandini F.², Tovani A.³, Catelli E.¹

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

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

³*Medico Veterinario*

Summary

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease of chickens spread throughout the world caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2). Production losses resulting from clinical disease and MD-associated condemnation have been significantly reduced since the introduction of vaccination. A vaccination program, including the recombinant vaccine strain RN1250 (Prevexxion® RN), CVI988/Rispens and HVT, was applied in 5 groups of broiler breeders in the pullet phase of an industrial farm. Longitudinal field studies were performed sampling environmental dust, feathers and spleens, collected from 1 to 19 weeks of age to detect GaHV-2 vaccines and/or field strains. The study revealed the uptake of the RN1250 vaccine strain, demonstrated by the detection of the vaccine virus in feathers and in spleens from the first to the fourth week post-vaccination. Circulation of a virulent field GaHV-2 strain was observed from the 14th week of age not associated with the presence of clinical outbreaks of MD, revealing the efficacy of the vaccination plan applied.

INTRODUZIONE

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

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

Negli allevamenti di ovaiole e riproduttori pesanti italiani circolano ceppi ad elevata virulenza (vMDV o vvMDV) in grado di determinare la forma acuta della malattia, caratterizzata da linfomi viscerali (Mescolini et al., 2019).

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

Recentemente è stato messo in commercio il vaccino ricombinante RN1250 (Prevexxion® RN, Boehringer Ingelheim Animal Health), costituito dal ceppo virale CVI988/Rispens in cui sono state inserite sequenze genomiche del ceppo Md5 (vvMDV) di GaHV-2, e del ceppo RM1 (vMDV); oltre ai segmenti Long Terminal Repeats (LTR) derivati dal retrovirus della Reticoloendoteliosi (REV).

Per valutare la cinetica del vaccino ricombinate RN1250 e verificare l'efficacia di un piano vaccinale che include RN1250, CVI988/Rispens e HVT, è stato svolto uno studio longitudinale di campo in cinque gruppi di riproduttori pesanti. Penne, milze e polveri ambientali sono stati testati mediante protocolli molecolari specifici per GaHV-2 e RN1250.

MATERIALI E METODI

Riproduttori pesanti oggetto dello studio e campionamento

Sono stati effettuati studi longitudinali in 5 gruppi di riproduttori pesanti di un allevamento industriale in cui in passato si erano verificati focolai di MD acuta in fase di deposizione.

Per il controllo della Malattia di Marek i gruppi erano stati vaccinati nei primi giorni di vita come indicato in Tabella 1.

Tabella 1. Programma vaccinale per MD nei gruppi oggetto di indagine.

ETA' E VIA DI SOMMINISTRAZIONE	VACCINI
18° giorno di incubazione - <i>In ovo</i>	Ceppo CVI988/Rispens + HVT
1 giorno di età – sottocutanea	Ceppo CVI988/Rispens + HVT
2 giorni di età – sottocutanea	Ceppo RN1250 (Prevexxion RN) e vHVT-IBD (Vaxxitek HVT+IBD), Boehringer Ingelheim

Il programma di vaccinazione, rispetto ai cicli d'allevamento precedenti, ha sostituito l'impiego dei ceppi vaccinali CVI988/Rispens e HVT con i vaccini Prevexxion RN e Vaxxitek HVT + IBD (Boehringer Ingelheim).

Dalla 1ª alla diciannovesima settimana di età, da ogni gruppo sono stati prelevati settimanalmente campioni di polvere ambientale e di penne (10 animali/gruppo, 5 penne/animale). Cinque animali per gruppo sono stati inoltre soppressi per la raccolta di campioni di milza.

Processazione del campione ed estrazione del DNA

Ciascun campione di polvere (1 ± 0.09 g) è stato posto in una provetta conica da centrifuga da 15 ml, risospeso in 5 ml di PBS sterile e centrifugato a 2500g per 15 minuti a +4°C. Il surnatante ottenuto è stato centrifugato una seconda volta utilizzando gli stessi parametri. Dopo la seconda centrifugazione, il surnatante è stato prelevato con una siringa e filtrato attraverso un filtro sterile per siringa da 0.45 µm. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 200 µl di filtrato di polvere

utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL). Quest'ultimo kit è stato utilizzato anche per l'estrazione del DNA dalle penne e dalle milze, processate singolarmente o in pool.

PCR nested per RN1250 e per GaHV-2

Il DNA estratto è stato impiegato in due protocolli di nested PCR, uno per identificare la presenza di GaHV-2 e differenziare, mediante sequenziamento dell'amplificato, il ceppo vaccinale CVI988/Rispens (Mescolini et al., 2019) dai ceppi GaHV-2 di campo; e l'altro per amplificare una porzione univoca del ceppo RN1250, mediante *primers* specifici disegnati sulla base della sequenza nucleotidica del ceppo RM1 presente in GenBank (numero di accesso S82226).

RISULTATI

I risultati dell'indagine sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Positività alla PCR nested e caratterizzazione per RN1250, CVI988/Rispens e GaHV-2 nei gruppi oggetto di indagine

Età (settimane)	MILZE			PENNE			POLVERE		
	RN1250	CVI988/ Rispens	GaHV-2	RN1250	CVI988/ Rispens	GaHV-2	RN1250	CVI988/ Rispens	GaHV-2
1	6/25 ^a	11/25	0/25	10/50	18/50	0/50	0/5	0/5	0/5
2	8/25	15/25	0/25	0/30	15/30	0/30	0/5	5/5	0/5
3	6/25	13/25	0/25	0/30	27/30	0/30	0/5	5/5	0/5
4	0/5	2/5	0/5	1/10	10/10	0/10	0/5	5/5	0/5
6	0/5	2/5	0/5	0/10	6/10	0/10	0/5	5/5	0/5
10	1/5	0/5	0/5	0/10	2/10	0/10	2/5	5/5	0/5
14	-	-	-	-	-	-	1/5	5/5	1/5
17	-	-	-	-	-	-	3/5	5/5	3/5
19	0/5	0/5	0/5	0/10	1/10	0/10	0/5	5/5	3/5

^a: n. positivi/n. campioni;

-: campionamento non effettuato.

Alla nested PCR per il ceppo vaccinale RN1250 sono risultate positive le milze prelevate dagli animali alla 1^a, 2^a, 3^a e 10^a settimana di vita, le penne prelevate alla 1^a e 4^a settimana di vita e le polveri ambientali prelevate dalla 10^a alla 17^a settimana di vita. Il ceppo vaccinale CVI988/Rispens è stato rilevato nelle milze dalla 1^a alla 6^a settimana di vita e in penne e polveri durante tutto il periodo di campionamento. La presenza del ceppo GaHV-2 di campo è stata rilevata solo più tardivamente nelle polveri a partire dalla quattordicesima settimana di vita.

All'analisi di sequenza i ceppi di campo presentavano caratteristiche molecolari di elevata virulenza, tuttavia, nel periodo di osservazione non sono state riportate manifestazioni cliniche o lesioni ascrivibili a MD.

DISCUSSIONE

Questo studio ha evidenziato l'avvenuto *uptake* del ceppo vaccinale RN1250, dimostrato dalla presenza del virus vaccinale nelle penne e nelle milze dalla prima alla quarta settimana post-vaccinazione. La positività al vaccino ricombinante sin dai primi giorni di vita potrebbe indicare la capacità del ceppo RN1250 di stimolare una precoce protezione immunitaria, che, oltre a proteggere l'animale nei riguardi di un challenge precoce da MDV, diminuisce la circolazione del ceppo di campo riducendo la probabilità di selezione di ceppi a maggiore virulenza. L'eliminazione di RN1250 avviene in maniera costante come testimoniato dall'accumularsi progressivo del virus vaccinale nelle polveri ambientali che sono risultate positive a partire dalla decima settimana post-vaccinazione; l'apparente intermittenza dell'eliminazione del ceppo vaccinale RN1250, rilevata testando le penne, è probabilmente dovuta al comportamento tipico di latenza/replicazione degli herpes virus (Calnek & Witter, 2001).

In questo studio longitudinale è stata rilevata la presenza di un ceppo di campo di GaHV-2 ad elevata virulenza a partire dalla quattordicesima settimana post-vaccinazione. È importante precisare che i vaccini oggi in commercio sono definiti imperfetti o "leaky", ossia, seppur capaci di tenere sotto controllo la malattia di Marek in forma clinica, non in grado di impedire l'infezione, la replicazione e l'eliminazione nell'ambiente di ceppi di campo di GaHV-2 ad elevata virulenza (Islam & Walkden-Brown, 2007; Islam et al., 2008; Islam et al., 2014; Ralapanawe et al., 2016). Tuttavia, nonostante la rilevazione del ceppo di campo nei gruppi oggetto di studio, non sono state osservate forme cliniche e/o lesioni riferibili a MD nell'arco di tutto il ciclo produttivo dei riproduttori, indice dell'efficacia protettiva del protocollo vaccinale applicato, nel periodo di osservazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Calnek, B. W., & Witter, R. L. (2001). Malattia di Marek. In B. W. Calnek, J. H. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, & Y. M. Saif, *Patologia Aviaria* (p. 411-446). Città di Castello (PG): Editorial board for the American Association of Avian Pathologists.
2. Carrozza, J.H., Fredrickson, T.N., Prince, R.P. & Luginbuhl, R.E. (1973). Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian Dis.* 17: 767-781.
3. Jurajda, V. & Klimes, B. (1970). Presence and survival of Marek's disease agent in dust. *Avian Dis.* 14:188-190.
4. Islam, A., & Walkden-Brown, S. W. (2007). Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J. Gen. Virol.* 88(pt8), 2021-2028.
5. Islam, A., Walkden-Brown, S. W., Groves, P. J., & Underwood, G. J. (2008). Kinetics of Marek's disease virus (MDV) infection in broiler chickens 1: effect of varying vaccination to challenge interval on vaccinal protection and load

- of MDV and herpesvirus of turkey in the spleen and feather dander over time. *Avian Pathol.* 37(3), 225-235.
6. Islam, T., Walkden-Brown, S. W., Ren, K. G., Islam, A., & Ralapanawe, S. (2014). Replication kinetics and shedding of very virulent Marek's disease virus and vaccinal Rispens/CVI988 virus during single and mixed infections varying in order and interval between infections. *Vet. Microbiol.*, 173(3-4), 208-23.
 7. Mescolini G., Lupini C., Davidson I., Massi P., Tosi G. & Catelli. E. (2019). Marek's disease viruses circulating in commercial poultry in Italy in the years 2015-2018 are closely related by their meq gene phylogeny. *Transbound Emerg Dis.*
 8. Ralapanawe, S., Walkden-Brown, S. W., Islam, A., & Renz, K. G. (2016). Effects of Rispens CVI988 vaccination followed by challenge with Marek's disease viruses of differing virulence on the replication kinetics and shedding of the vaccine and challenge viruses. *Vet. Microbiol.* 183, 21-9.
 9. Read, A.F., Baigent, SJ, Powers, C., Kgosana, L.B., Blackwell, L., Smith, L.P., Kennedy, D.A., Walkden-Brown, S.W. & Nair V.K. (2015). Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. *PLOS Biology* 13: e1002198.
 10. Schat, K.A. & Nair. V. (2013). Marek's disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, and V Nair (Eds.), *Diseases of Poultry* 13th edn, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, pp.515-552.

STUDIO *IN VIVO* DELL'EFFICACIA DI UN SISTEMA DI LAMPADE A UVC A 222 NM PER L'INATTIVAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA

Tucciarone C.M.¹, Cecchinato M.^{1,2}, Vianello L.¹, Simi G.³, Morandin M.⁴, Borsato E.³, Silvestrin L.³, Giorato M.³, Salata C.⁵, Greggio E.⁶, Drigo M.¹

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

² *Dipartimento di Biomedicina Comparata e Anatomia (BCA), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (PD), Italia;*

³ *Dipartimento di Fisica e Astronomia (DFA), Università degli Studi di Padova, Via Francesco Marzolo, 8, 35121 Padova, Italia;*

⁴ *Sezione di Padova dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), Via Francesco Marzolo, 8, 35131 Padova, Italia;*

⁵ *Dipartimento di Medicina Molecolare (DMM), Università degli Studi di Padova, Via Gabelli 63, 35121 Padova, Italia;*

⁶ *Dipartimento di Biologia (DiBio), Università degli Studi di Padova, Viale Giuseppe Colombo, 3, 35131 Padova, Italia.*

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is one of the most important pathogens in poultry. IBV is a coronavirus featured by an airborne transmission, that is mostly controlled by biosecurity and vaccination. Due to the importance of implementing new tools to control this problem and to the renewed interest towards coronavirus, the efficiency of UVC lamps (222 nm) at inactivating IBV was tested on aerosol containing a nebulized vaccine. The aerosol was produced by an instrument nebulizing the vaccine and hosting the UVC lamps. The aerosol was administered to two groups of day-old chicks that were monitored for clinical signs, sampled by choanal swabs daily for 9 days post exposure and tested by vaccine specific real time RT-PCR. The first group was the control one, for the evaluation of the efficacy of the nebulizing instrument and the administration route, thus the lamps were switched off and allowed the vaccine take by the animals and the detection of increasing vaccine titers in the first days, attesting the replication of the live vaccine. The second group was exposed to the aerosol once exposed to the UVC rays, thus the animals remained negative for all observation period, revealing the efficacy of the UVC lamps in inactivating the virus below the necessary infectious dose. These results are promising for a wider application of the UVC lamps, both in veterinary field and in public health.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva (IBV) è un patogeno estremamente importante in avicoltura, responsabile di problematiche respiratorie, renali e riproduttive, a seconda del ceppo virale e della categoria animale coinvolti, con cali di produzione, perdite economiche e predisposizione ad infezioni secondarie (Jackwood & Wit, 2020). Il controllo della bronchite infettiva è demandato alla vaccinazione, che prevede la somministrazione di vaccini vivi attenuati e talvolta inattivati, a seconda del proto-

collo e della categoria produttiva (Jordan, 2017).

L'immunizzazione però non garantisce la totale protezione nei confronti di questo virus, proprio per la presenza di varianti, per il *coverage* vaccinale a volte subottimale della popolazione, per l'estrema facilità di trasmissione e per i contatti molto stretti all'interno dei capannoni. Oltre alla biosicurezza, altri devono essere quindi gli strumenti affiancati alla vaccinazione nella lotta contro questo ed altri patogeni. La ricerca di soluzioni in grado di abbattere la carica virale e la pressione infettante in ambienti ad elevata contaminazione, ha stimolato la valutazione dell'efficacia delle lampade a UVC nell'inattivazione dei coronavirus. Le lampade a UVC ad eccimeri (222nm) hanno il vantaggio di non essere nocive per gli organismi superiori e sono state già sperimentalmente testate nei confronti di patogeni come il virus dell'influenza aviaria (Welch et al., 2018) e il virus della Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) (Li et al., 2021), con l'obiettivo di sondare uno strumento applicabile sia in ambito veterinario, sia con una visione One Health con applicazione in contesti pubblici.

Questo studio ha valutato l'efficacia di lampade a UVC ad eccimeri (222 nm), nell'inattivare un aerosol contenente IBV e nel prevenirne la replicazione all'interno di un modello di popolazione animale esposta ad un patogeno a trasmissione tramite aerosol.

MATERIALI E METODI

Scelta del virus

Per effettuare lo studio in massima sicurezza, è stato scelto di utilizzare un vaccino vivo attenuato basato sul ceppo 1/96 del virus della bronchite infettiva (Cevac IBird®, Ceva Animal Health Ltd, France), registrato per la somministrazione via spray a pulcini di un giorno di vita. Due fiale da 1000 dosi sono state riospese in 100 ml ciascuna e utilizzate per la soluzione destinata alla produzione dell'aerosol contenente il virus.

Allestimento dello strumento di nebulizzazione e irraggiamento dell'aerosol

Lo strumento per la produzione dell'aerosol è stato predisposto dalla Divisione di Padova dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) e dal Dipartimento di Fisica e Astronomia (DFA) a partire dal prototipo descritto da Welch et al. (2018). Il flusso d'aria era prodotto da una bombola di azoto compresso, connessa ad un riduttore di pressione con uno sdoppiatore, prima dell'ingresso in un flussimetro a galleggiante per la regolazione dei flussi. Una parte del flusso era diretta alla produzione dell'aerosol nel nebulizzatore, in cui era stato diluito il vaccino, l'altra parte del flusso raggiungeva direttamente il tunnel di irraggiamento per la produzione di aria secca. A valle del nebulizzatore era posto un tunnel metallico in cui erano alloggiati le lampade a UVC ad eccimeri (222 nm), raggiunto dai tubi provenienti dal nebulizzatore e dal flussimetro. All'interno del tubo erano stati alloggiati quattro deflettori e all'estremità è stato posto un contenitore per alloggiare gli animali durante l'esposizione al flusso.

Settaggio dello strumento di nebulizzazione e irraggiamento

Lo strumento è stato regolato per nebulizzare 10 ml di soluzione contenente il vaccino in un tempo di 40 minuti di esposizione, somministrando 9 l/min di azoto e 4.5

l/min di aerosol, generato ad una velocità di 1.5cm/s, permettendo un'esposizione agli UVC di 10 secondi, con una dose di irraggiamento minimo di 8.7 mJ/cm² (dose media 13.6 mJ/cm²) e un fattore di inattivazione di 10⁷. Le lampade sono rimaste spente durante l'esposizione del primo gruppo (gruppo A) in modo da verificare il corretto funzionamento dello strumento attraverso il ritrovamento del vaccino, mentre sono state accese soltanto durante la produzione dell'aerosol a cui è stato esposto il secondo gruppo di animali (gruppo B).

Prova in vivo

Due gruppi di 20 pulcini di broiler di un giorno di vita sono stati arruolati per l'esecuzione del trial. Le due prove sono state effettuate con un intervallo di sette giorni l'una dall'altra, per garantire un vuoto sanitario e le corrette procedure di disinfezione. Gli animali sono stati alloggiati in contenitori uguali durante l'esposizione al flusso e rispettando le stesse condizioni ambientali e di alimentazione per i seguenti nove giorni di osservazione. Quindici animali per gruppo sono stati identificati singolarmente con un numero progressivo su targhette apposte al piede. Gli animali sono stati osservati individualmente e quotidianamente per il rilievo di eventuali segni clinici.

Campionamento e analisi di laboratorio

I pulcini di entrambi i gruppi sono stati campionati all'arrivo e prima di essere esposti all'aerosol, mediante tamponi in fessura palatina, per la ricerca della presenza del vaccino e il primo punto di campionamento è stato analizzato in pool, per escludere contaminazioni avvenute in incubatoio. Gli animali identificati (1-15) sono poi stati campionati quotidianamente e individualmente. I campioni dei due gruppi sono stati stoccati a -80°C fino alla fine del periodo di osservazione, per essere poi analizzati separatamente, per evitare contaminazioni. I campioni sono stati sottoposti individualmente ad estrazione degli acidi nucleici mediante il kit High Pure Viral Nucleic Acid® Kit (Roche, Svizzera) e analizzati mediante una metodica di real time RT-PCR specifica per il ceppo 1/96, descritta da Tucciarone et al. (2018) *the usual second vaccination is more and more often moved up to the chick's first d of life. The second strain administration together with the common Mass priming by spray at the hatchery allows saving money and time and reducing animal stress. The present work compared the different vaccine strains (Mass-like or B48, and 1/96 con il kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA) sul termociclatore LightCycler® 96 Instrument (Roche, Svizzera).*

RISULTATI

Durante le due prove non è stata osservata mortalità. Entrambi i pool di tamponi prelevati prima dell'esposizione al flusso sono risultati negativi. Alcuni degli animali del gruppo A, esposto all'aerosol non irraggiato, hanno mostrato sintomi respiratori lievi e sporadici, con un picco al quarto giorno post esposizione. Tutti i campioni prelevati nel gruppo A sono risultati positivi fino al quinto giorno, con un trend in aumento del titolo virale, successivamente sono state evidenziate delle positività intermittenti e i titoli riscontrati sono apparsi meno omogenei (Figura 1).

Nessun animale del gruppo B ha mostrato sintomi né è risultato positivo alla real time RT-PCR specifica per il ceppo 1/96.

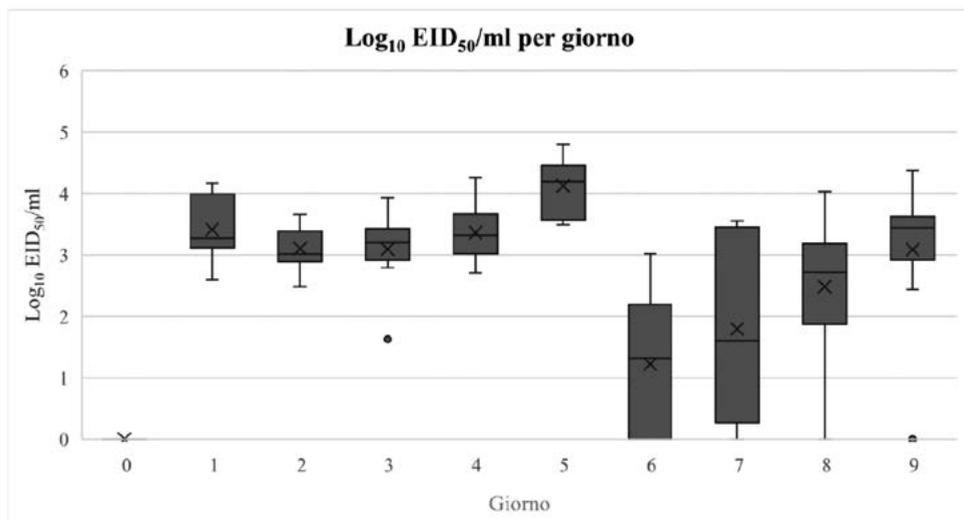


Figura 1: Box plot dei titoli virali nel gruppo A (x = media del gruppo).

DISCUSSIONE

Questo studio ha permesso di valutare l'efficacia di lampade a UVC ad eccimeri (222 nm) nell'inattivare il virus della bronchite infettiva aviaria. La positività degli animali del primo gruppo e l'aumento dei titoli virali nei primi giorni di osservazione dimostrano infatti il buon funzionamento del sistema di nebulizzazione e l'assenza di un'attività virucida meccanica da parte del prototipo, data la replicazione vaccinale che sottende al rapido aumento dei titoli. Al contrario, l'assenza di RNA vaccinale negli animali del gruppo B è imputabile all'azione virucida delle lampade accese, essendo questa l'unica differenza tra i due gruppi.

La presenza di lievi sintomi nel gruppo A è interpretabile come una blanda reazione vaccinale, probabilmente causata da due principali differenze nella somministrazione rispetto alle condizioni standard previste in incubatoio. Infatti, nonostante il vaccino sia assunto per via inalatoria anche in incubatoio, le condizioni ottimali di vaccinazione prevedono la produzione di uno spray con particelle di diametro maggiore, in modo da evitare una penetrazione troppo profonda del vaccino nelle vie aeree. Durante la presente prova, sono state prodotte invece delle particelle di dimensioni inferiori, per mimare l'aerosol con cui i patogeni si propagano in infezioni naturali. Inoltre, per garantire la nebulizzazione corretta del vaccino e minimizzarne la dispersione, è stata utilizzata una dose maggiore. L'insieme di questi due fattori, volume delle particelle e dose di vaccino, potrebbero aver contribuito ad accentuare gli effetti solitamente trascurabili della vaccinazione contro IBV. La dose di vaccino maggiore potrebbe anche aver contribuito alla precoce positività degli animali che, in altri studi di cinetica (Pellattiero et al., 2018; Tucciarone et al., 2018; Tucciarone et al., 2018) we tested the potential environmental persistence, transmission ability and replication capability of a non-directly administered vaccine strain

at a hatchery and during transportation. To this purpose, we examined a single hatchery, where combined vaccination (Mass-like plus 793B-like strains effettuati dopo vaccinazione spray standard, mostravano le prime positività generalmente a partire dal secondo giorno post esposizione).

CONCLUSIONI

La conferma dell'efficacia delle lampade a UVC nell'inattivazione di un coronavirus è un risultato estremamente importante e promettente. Una volta ottimizzati il funzionamento, la potenza e i costi, queste lampade potrebbero trovare ampio utilizzo in ambito veterinario, negli allevamenti per sanificare i flussi d'aria in ingresso e in uscita, nella dogana danese, o anche in incubatoio, dove sono somministrate dosi elevate di diversi vaccini vivi attenuati, per prevenire le cross-contaminazioni. Allo stesso modo, l'efficacia contro virus di interesse per la salute umana, come appunto i coronavirus, le rende uno strumento interessante per l'applicazione anche in situazioni ad elevato rischio e contaminazione, come strutture ospedaliere e spazi pubblici affollati. Infatti, i raggi generati da questo tipo di lampade non sono dannosi per gli organismi superiori e ciò potrebbe offrire la possibilità di utilizzarle per diminuire la pressione infettante negli ambienti anche in presenza di persone o animali, al posto di soluzioni più impattanti come l'ozonizzazione. I risultati finora ottenuti dall'utilizzo delle lampade a UVC ad eccimeri (222 nm) sono estremamente promettenti, ma ulteriori studi devono essere condotti per misurarne l'efficacia in contesti d'uso diversi e assicurare la sicurezza dell'utilizzo anche a dosi elevate di irraggiamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Jackwood, M. W., & Wit, S. (2020). Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry* (pp. 167–188). Wiley.
2. Jordan, B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Veterinary Microbiology*, 206, 137–143.
3. Li, P., Koziel, J., Zimmerman, J., Zhang, J., Cheng, T.-Y., Yim-Im, W., Jenks, W., Lee, M., Chen, B., & Hoff, S. (2021). Mitigation of Airborne PRRSV Transmission with UV Light Treatment: Proof-of-Concept. *Agriculture*, 11(3), 259.
4. Pellattiero, E., Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Koutoulis, K., Meini, A., Zangrandi, C., Ramon, G., Drigo, M., & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of unintended 1/96 infectious bronchitis vaccine transmission in broilers after direct contact with vaccinated ones. *Veterinarni Medicina*, 63(06), 287–291.
5. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Ramon, G., Koutoulis, K. C., Catelli, E., & Cecchinato, M. (2018). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-Time RT-PCR quantification. *Poultry Science*, 97(1), 303–312.
6. Tucciarone, Claudia M., Franzo, G., Bianco, A., Berto, G., Ramon, G., Paulet, P., Koutoulis, K. C., & Cecchinato, M. (2018). Infectious bronchitis virus gel vaccination: evaluation of Mass-like (B-48) and 793/B-like (1/96) vaccine kinetics after combined administration at 1 day of age. *Poultry Science*, 97(10), 3501–3509.
7. Valastro, V., Holmes, E. C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M. W., Cattoli, G., & Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis vi-

rus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 349–364.

8. Welch, D., Buonanno, M., Grilj, V., Shuryak, I., Crickmore, C., Bigelow, A. W., Randers-Pehrson, G., Johnson, G. W., & Brenner, D. J. (2018). Far-UVC light: A new tool to control the spread of airborne-mediated microbial diseases. *Scientific Reports*, 8(1), 2752.
9. Zappulli, V., Ferro, S., Bonsembiante, F., Brocca, G., Calore, A., Cavicchioli, L., Centelleghè, C., Corazzola, G., De Vreese, S., Gelain, M. E., Mazzariol, S., Moccia, V., Rensi, N., Sammarco, A., Torrigiani, F., Verin, R., & Castagnaro, M. (2020). Pathology of Coronavirus Infections: A Review of Lesions in Animals in the One-Health Perspective. *Animals*, 10(12), 2377.

INDAGINI PRELIMINARI SUL RUOLO RIVESTITO DA VOLATILI SELVATICI COME POTENZIALI RESERVOIR DI MICRORGANISMI ANTI-BIOTICO-RESISTENTI

Musa L.¹, Casagrande Proietti P.¹, Stefanetti V.¹, Toppi V.¹, Gobbi M.², Costantino I.³, Aisa F.³, Brescia M.³, Franciosini M.P.¹

¹*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia;*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', 06124 Perugia, Italy.*

³*Ospedale Veterinario Universitario Didattico, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia;*

Summary

Recently wild birds are matter of interest from the scientific community as potential spreaders of antibiotic resistance gene in urban and suburban environment also for the ability to migrate long distances in short periods. The aim of this work was to evaluate the antibiotic- susceptibility of commensal *Escherichia coli*, and the possible presence of ESBL *E. coli* and *Salmonella* spp. in some species of wild birds admitted to the Veterinary Hospital (Department of Veterinary Medicine, University of Study, Perugia). Most of the birds were represented by nocturnal and diurnal raptors and came from WildUmbria, a wildlife rescue center, showed traumatic lesions (hunting injuries, traumatic shock etc.). Cloacal swabs were collected before possible antimicrobial treatments. A total of 70 *E. coli* isolates were obtained from 70 samples (100%), while *Salmonella* spp. was not detected unlike other works documenting the presence of this microorganism in magpies, crows, gulls. Ampicillin, (61.42%); ($P < 0.001$), amoxicillin with clavulanic acid (42.85%); ($P < 0.001$) and ciprofloxacin (18.57%), were found to be the antibiotics against which bacterial strains displayed the highest prevalence of resistance. This is not surprising since these molecules are widely used in both veterinary and human medicine. It should also be reported that 10 out of 70 isolates (14.28%) showed multidrug-resistant (MDR) profile with the constant presence of beta lactam category. Five out of 70 *E. coli* isolates (7.14%) were Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) and four showed a multi-resistance profile and 2 displayed resistance to imipenem, often considered of last choice against human infections by "super resistant" bacteria. All *E. coli* isolates were sensitive to colistin with value MIC < 2 mg/L. Lack of resistance to colistin by *E. coli* isolates, in line with what it is reported in the literature, is likely due in part to the use off-label of this molecule in the veterinary sector. Diet, which for some species is represented by carcasses (rabbits, hares, badgers, rats, rodents), municipal and livestock waste could be responsible for the presence of the resistant gene in wildlife.

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni l'interesse della comunità scientifica si è rivolto verso gli animali selvatici, volatili inclusi, quali potenziali soggetti sentinella in grado di rivelare il livello di contaminazione ambientale, in particolare del suolo, da parte di batteri veicoli di geni responsabili di antibiotico-resistenza (Bonnedahl e Järhult et al. 2014). Va considerato

inoltre che questi animali possono acquisire microrganismi resistenti da diverse nicchie ecologiche e nel caso di alcuni volatili, di diffonderli anche in aree geografiche diverse, vista la loro capacità di ricoprire lunghe distanze in breve tempo attraverso i percorsi migratori (Wang et al. 2017). Molti sono i fattori che contribuiscono alla contaminazione del suolo da parte di batteri/geni della resistenza: acque di scarico provenienti da allevamenti intensivi, discariche e impianti di trattamento delle acque reflue e la stessa fauna selvatica tramite anche l'escrezione fecale (Tardón et al. 2021). *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. sono considerati alcuni tra i batteri maggiormente responsabili della co-circolazione dei geni di resistenza tra l'ambiente, gli animali e l'uomo in quanto considerate specie in cui la selezione dei geni di resistenza è avvenuta più rapidamente nel corso degli anni, a seguito dell'uso diffuso di antimicrobici (Seiffert et al. 2013). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il profilo di antibiotico-resistenza di ceppi di *E.coli* commensali, l'eventuale presenza di *E.coli*, *E.coli* ESBL e *Salmonella* spp. isolati in volatili selvatici ricoverati presso l'Ospedale Didattico Veterinario di Perugia (Dipartimento di Medicina Veterinaria-DMV).

MATERIALI E METODI

Campionamento

Un totale di 70 tamponi cloacali è stato prelevato da differenti specie di volatili selvatici al momento del ricovero nell'Ospedale Didattico, DMV, per eseguire il prelievo prima che venissero iniziate possibili terapie con antimicrobici. La maggior parte dei volatili, rappresentata da rapaci notturni e diurni, proveniva dal Centro di recupero animali selvatici "WildUmbria" e presentava alla visita clinica, lesioni riconducibili ad eventi traumatici (ferite da caccia, traumi da urti etc). Poiane e gheppi sono risultate le specie maggiormente investigate tra i rapaci diurni mentre civetta e assiolo tra quelle notturne (Tabella 1).

Tabella 1: Elenco e numero dei volatili selvatici testati in base all'Ordine di appartenenza

Specie	Numero
Rapaci diurni	29
Rapaci notturni	13
Passeriformi	8
Apopoidi	4
Columbiformi	7
Upupidi	1
Piciformes	2
Galliformi	2
Caprimulgiformes	1
Ardeidi	3

Isolamento e identificazione di *E. coli*

Per l'isolamento di *E.coli*, i campioni sono stati posti in terreno di pre-arricchimento costituito da acqua peptonata tamponata (BPW) in rapporto 1:10 e quindi sono stati incubati a 37 °C per 18-24 ore in aerobiosi. Da ciascun campione così diluito è stata prelevata una quantità pari a 0.1 ml di soluzione e quindi seminata su agar MacConkey, incubato per 24 h a 37 °C in condizione di anaerobiosi. Le

colonie con una morfologia riferibile a *E. coli* sono state tipizzate mediante appropriate prove biochimiche.

Isolamento e identificazione di Salmonella. spp

I campioni sono stati diluiti in proporzione di 1:10 con soluzione peptonata e incubati a 37 °C per 18 h in terreno di pre-arricchimento. Successivamente aliquote pari 0,1 ml sono state trasferite in 10 ml nel terreno selettivo di Rappaport Vassiliadis (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI) e incubato a 42 °C per 24 h. 10 µl delle diverse colture sono stati seminati su piastre di cromogeno (Liofilchem s.r.l, Roseto degli Abruzzi, Te, Italia) ed incubate a 37 °C per 24 h. Le colonie riconducibili a *Salmonella* spp., (ISO-6579) sono state sottoposte a tipizzazione tramite agglutinazione diretta con antisieri specifici seguendo lo schema di Kaufmann-White-Le Minor.

Test di suscettibilità antimicrobica e determinazione di ESBL degli isolati di E. coli

La suscettibilità antimicrobica è stata valutata con il metodo di Kirby-Bauer per i seguenti antibiotici e classe di appartenenza (Tabella 2): imipenem (IMP) (10 µg), ceftaxime (FOX) (30 µg), cefepime (FEP) (30 µg), cefotaxime (CTX) (30 µg), ceftazidime (CAZ) (30 µg), ampicillina (AMP) (10 µg), amoxicillina/acido clavulanico (AMC) (30 µg)b cloramfenicolo (CHL) (30 µg), azitromicina (AZM) (15 µg), acido nalidixico (NA) (30 µg), ciprofloxacina (CIP) (5 µg), tetraciclina (TE) (30 µg), sulfamethozaole/trimethoprim (SMX) (25 µg), gentamicina (CN) (10 µg). Per la colistina, la valutazione della suscettibilità è stata effettuata in triplicato mediante microdiluzione in piastra (cut-off >2 mg/L). Per tutti i ceppi di *E. coli* è stata valutata la produzione di ESBL tramite il test sinergico a doppio disco (DDST) e tramite la microdiluzione in piastra (Sensititre™ ESBL plates, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy). I risultati sono stati valutati seguendo i breakpoint stabiliti da EUCAST.

Tabella 2: Classe di appartenenza e antibiotici testati nel test di suscettibilità antimicrobica Kirby-Bauer e microdiluzione in piastra*

Antibiotici	Classe
Imipenem	Beta-lattamici
cefoxitina	
Cefepime	
Cefotaxime	
Ceftazidime	
Ampicillina	
Amoxicillina/acido clavulanico	
Cloramfenicolo	
Azitromicina	Macrolidi
Acido Nalidixico	Chinoloni
Ciprofloxacina	
Tetraciclina	Tetracicline
Sulfametoxazolo	Sulfamidici
Gentamicina	Aminoglicosidi
Colistina*	Polimixine

Analisi statistica

Si è effettuata un'analisi statistica, considerando i selvatici come unica categoria, al fine di valutare se le variazioni di suscettibilità di tutti gli isolati di *E. coli* nei confronti degli antibiotici testati fossero significative. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test statistico del Chi-quadro tramite il programma JASP (Versione 14.1) e i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $P \leq 0,05$.

RISULTATI

In totale sono stati isolati 70 ceppi di *E. coli* mentre non è stata isolata alcuna *Salmonella* spp. Cinquantanove ceppi di *E. coli* hanno mostrato un'elevata prevalenza di resistenza alla ampicillina (84,28%); ($P < 0,001$), seguita dalla resistenza alla amoxicillina associata ad acido clavulanico con 30 isolati resistenti (42,85%); ($P < 0,001$). La resistenza a ciprofloxacina e cefotaxime ha presentato valori pari a 18,57% e 17,14 % rispettivamente. Un'elevata suscettibilità è stata riscontrata nei confronti di cloramfenicolo (94,28%) e azitromicina (97,14%). Tutti gli isolati sono risultati sensibili alla colistina (Tabella 3). Dieci isolati su 70 (14,28%) hanno mostrato un profilo di multiresistenza, sempre inclusivo della categoria dei beta-lattamici, con il pattern di resistenza a 4 classi di antibiotici maggiormente rappresentato (6/10, 60%) (Tabella 4). In 2 di questi isolati era presente la resistenza alla imipenem. Cinque su 70 isolati di *E. coli* (7,14%) erano ESBL e quattro hanno mostrato profili di multi-resistenza, 2 dei quali includevano resistenza all'imipenem.

Tabella 3: Numero e percentuale degli isolati di *E. coli* resistenti agli antibiotici testati

	Numero (S)	%	Numero (R)	%
Imipenem	64	91,42	6	5,57
Cefoxatina	65	92,85	5	7,14
Cefepime	63	90,00	7	10,00
Cefotaxime	58	82,85	12	17,14
Ceftazidime	62	88,57	8	11,42
Ampicillina	11	15,71	59	84,28
Amoxicillina/acido clavulanico	40	57,14	30	42,85
Cloramfenicolo	66	94,28	4	5,70
Azitromicina	68	97,14	2	2,85
Acido Nalidixico	64	91,42	6	5,57
Ciprofloxacina	57	81,42	13	18,57
Tetraciclina	62	88,57	8	11,42
Sulfametoxazolo	60	85,71	10	14,28
Gentamicina	62	88,57	8	11,42
Colistina	70	100	0	0
ESBL	65	92,85	5	7,14

Tabella 4: Pattern di multiresistenza degli isolati di *E. coli*

Pattern	Pattern di multiresistenza	<i>E. coli</i> (N)	<i>E. coli</i> (%)
3	BETA/CHIN/AMINO	1	10
	BETA/TET/SXT	1	10
4	BETA/CHIN/TET/SXT	3	30
	BETA/CHIN/SXT/AMINO	2	20
	BETA/MACRO/CHIN/SXT	1	10
5	BETA/MACRO/CHIN/TET/SXT	1	10
6	BETA/MACRO/CHIN/TET/SXT/AMINO	1	10

BETA (Beta-lattamici), MACRO (Macrolidi), CHIN (Chinoloni), TET (Tetracicline), SXT (Sulfamidici), AMINO (Aminoglicosidi)

DISCUSSIONE

Gli uccelli selvatici negli ultimi anni sono diventati oggetto di interesse da parte della comunità scientifica per il ruolo da loro svolto come “marker” rivelatori del grado di contaminazioni ambientale, aree urbane e suburbane incluse. In tale ottica si collocano gli studi sempre più frequenti, talvolta con risultati discordanti, riguardanti gli animali selvatici quali carrier di batteri/geni della resistenza nell’ecosistema (Guenther et al. 2010) they could likewise contribute to the dissemination of antimicrobial resistant bacteria in the environment. The aim of this study was therefore to get first insights into the antimicrobial resistance status among *E. coli* isolated from wild small mammals in rural areas. We tested 188 faecal isolates from eight rodent and one shrew species originating from Germany. Preselected resistant isolates were screened by minimal inhibitory concentration (MIC). In questa ricerca, le specie più frequentemente monitorate provenivano dal Centro di recupero “WildUmbria” ed erano rappresentate in maniera preponderante da volatili appartenente all’ordine degli Strigiliformi quali poiana e gheppio, tra i rapaci diurni, e civetta e assiolo tra i rapaci notturni. Queste specie erano recapitate al Centro soprattutto a causa di incidenti stradali, ferite a arma da fuoco, predazione e più raramente in seguito a intossicazioni e avvelenamenti, analogamente a quanto si verifica in altri centri (Dessalvi et al. 2021) the analyses focused upon the cause, provenance and species of hospitalised animals, the seasonal distribution of recoveries and the outcomes of hospitalisation in the different species. In addition, an in-depth analysis of the anthropogenic causes was conducted, with a particular focus on attempts of predation by domestic animals, especially cats. Significantly, 96.8% of animals hospitalised came from Liguria, the region in north-western Italy where CRAS is located, with 44.8% coming from the most populated and urbanised areas of Genoa, indicating a positive correlation between population density and the number of recoveries. A total of 5881 wild animals belonging to 162 species were transferred to CRAS during the six years study period. The presence of summer migratory bird species and the high reproductive rates of most animals in summer resulted in a corresponding seasonal peak of treated animals. Birds represented 80.9% of entries;

mammals accounted for 18.6% of hospitalisations; and about 0.5% of the entries were represented by reptiles and amphibians. Species protected by CITES and/or in IUCN Red List amounted to 8% of the total number of individuals. Consistent with results recorded elsewhere from Italy and other European countries, 53.9% of the specimens treated were released in nature; 4.7% were euthanised and 41.4% died. There was a significant difference between taxa in the frequency of individuals that were released, died or euthanised due to the intrinsic characteristics of species (more resistant or more adaptable to captivity than others. Va sottolineato che in tutti i soggetti è stata riscontrata una resistenza significativa degli isolati di *E. coli* alla ampicillina, seguita dall'amoxicilina, associata ad acido clavulanico in relazione al fatto che queste 2 molecole sono ampiamente utilizzate in medicina umana (Gilbert et al. 1974), mentre in campo veterinario l'amoxicillina è particolarmente impiegata nel corso di infezioni respiratorie nei mammiferi (Landers et al. 2012) e nei volatili in patologie enteriche sostenute da *Clostridium* spp. (Salvarani et al. 2012). È verosimile quindi supporre che i risultati ottenuti in questo caso siano la conseguenza di una contaminazione dei soggetti testati dovuta alle acque reflue degli allevamenti e dei centri urbani convergenti nell'ambiente. Il riscontro di *E. coli* resistenti a cefotaxime, beta lattamico di terza generazione, è un dato di interesse se si considera che, nonostante il divieto di utilizzo di cefalosporine negli animali da reddito, incluso il pollame, la resistenza alle cefalosporine è riportata in diverse specie di interesse zootecnico quali bovini al pascolo (Markland et al. 2019) e polli e galline allevati industrialmente. In questo ultimo caso si tratterebbe di contaminazione per via verticale dovuta alla trasmissione di geni della resistenza da parte dei riproduttori, in relazione alla struttura di produzione piramidale che caratterizza il settore avicolo (Musa et al. 2020). Gli isolati di *E. coli* sono risultati per la maggior parte sensibili ai macrolidi, rappresentati in questo lavoro da azitromicina, e al cloramfenicolo. Unica eccezione è costituita dagli isolati di *E. coli* provenienti da succiacapra e rondone, entrambi specie migratorie e pertanto in grado di trasportare i geni di resistenza a lunga distanza. L'azitromicina non viene comunemente usata negli allevamenti zootecnici sebbene abbia dato risultati confortanti nella terapia delle criptosporidiosi nel bovino (Yagci et al. 2017) e l'uso del cloramfenicolo è vietato in diversi Paesi negli animali da reddito (Benford et al. 2014). Va comunque specificato che i macrolidi, in particolare la tilosina, in virtù anche del tempo di sospensione pari a zero, è largamente impiegata in ambito veterinario, nelle infezioni sostenute da Micoplasmi e gram positivi (de Jong et al. 2021). Non è stato osservato nessun fenomeno di resistenza nei confronti della colistina. In generale nei Paesi dell'Unione Europea la prevalenza di resistenza alla colistina da parte di *E. coli* risulta tendenzialmente bassa, sebbene si possano avere delle variazioni in relazione al maggiore uso del farmaco in alcuni stati membri (EFSA, 2019). Il profilo fenotipico di resistenza a 4 classi di antibiotici è stato quello maggiormente rappresentato e in 2 di questi isolati si è osservata anche la resistenza all'imipenem, una cefalosporina di ultima generazione, spesso considerata nel trattamento di super infezioni batteriche in pazienti umani (Wu et al. 2014). Cinque isolati su 70 sono risultati ESBL e, ad eccezione di uno, sono risultati caratterizzati da un profilo di multiresistenza. I batteri ESBL rappresentano una grave minaccia per la salute pubblica a livello globale e come è noto sono responsabili di gravi malattie infettive nell'uomo e negli animali, spesso a carattere setticemico (Ewers et al. 2012) using multilocus sequence typing (MLST, pertanto la

loro presenza nella fauna selvatica e nell'ambiente è fonte di crescente preoccupazione (Guenther et al. 2017) although recent studies have also shown chromosomal integration, e.g. in clinical *E. coli* isolates of ST38. As ESBL-producing *E. coli* are also found in nonclinical settings, we were interested in determining whether chromosomally integrated ESBL genes occur in ST38 isolates from non-clinical habitats, e.g. wildlife. Methods: Four ESBL-producing *E. coli* isolates of ST38 originating from Mongolian birds of prey sampled in 2015 were subjected to a detailed analysis in terms of phenotypic resistance, plasmid profiling and WGS, followed by the determination of genotypic resistance factors including the chromosomal integration of ESBL and carbapenemase genes. Results: Results based on phenotypic and genotypic plasmid profiling, contiguous sequence (contig. *Salmonella* spp. non è stata isolata nei volatili testati in questo studio, a differenza di altri lavori che documentano la presenza di tale microrganismo in gazze, cornacchie, e gabbiani (Palmgren et al. 2006; Rubini et al. 2016) 1998-2000, 1047 faecal swabs from Black-headed gulls were sampled at one location in Southern Sweden. *Salmonella* spp. was found in 28 individuals (2.7%. Va comunque riportato che la prevalenza di *Salmonella* spp. nei rapaci, i quali sono stati gli uccelli maggiormente monitorati, è generalmente minore di quanto si verifica in altri tipi volatili, quali gazze, cornacchie, gabbiani (Millán et al. 2004; Vogler et al. 2021) and 7.2% (9/123).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza nei selvatici la presenza di isolati di *E. coli* resistenti ad ampicillina e amoxicillina associata ad acido clavulanico, riconducibile a una verosimile contaminazione ambientale ma anche all'alimentazione che per alcune specie è rappresentata da carcasse (conigli, lepri, tassi, ratti, roditori) possibili carrier di geni di resistenza. E' da sottolineare il riscontro di resistenza a beta lattamici in tutti gli isolati di *E. coli* multiresistenti ed inoltre la presenza di alcuni ceppi resistenti a cefalosporine di III generazione, dovuta prevalentemente a fonti di contaminazione ambientale di origine umana. Questi risultati, confermando la bibliografia consultata, sottolineano la necessità di incrementare studi di monitoraggio al fine di meglio definire il ruolo degli animali selvatici nel circuito dell'antibiotico resistenza e di meglio determinare il potenziale rischio che rivestono per l'uomo come fonte di batteri/geni di resistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Benford, Diane, Sandra Ceccatelli, Bruce Cottrill, Michael DiNovi, Eugenia Dogliotti, Lutz Edler, Peter Farmer, et al. 2014. "Scientific Opinion on Chloramphenicol in Food and Feed." *EFSA Journal* 12 (11): 3907. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2014.3907>.
2. Bonnedahl, Jonas, and Josef D. Järhult. 2014. "Antibiotic Resistance in Wild Birds." *Uppsala Journal of Medical Sciences* 119 (2): 113–16. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>.
3. Dessalvi, Gabriele, Enrico Borgo, and Loris Galli. 2021. "The Contribution to Wildlife Conservation of an Italian Recovery Centre." *Nature Conservation* 44 (May): 1–20. <https://doi.org/10.3897/NATURECONSERVATION.44.65528>.
4. Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, and L. H. Wieler. 2012. "Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and AmpC-Producing *Escherichia Coli*

- from Livestock and Companion Animals, and Their Putative Impact on Public Health: A Global Perspective.” *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (7): 646–55. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03850.X>.
5. Gilbert, D. N. 1974. “Comparison of Amoxicillin and Ampicillin in the Treatment of Urinary Tract Infections.” *The Journal of Infectious Diseases* 129 (Supplement_2): S231–34. https://doi.org/10.1093/INFDIS/129.SUPPLEMENT_2.S231.
 6. Guenther, Sebastian, Mirjam Grobbel, Katrin Heidemanns, Mathias Schlegel, Rainer G. Ulrich, Christa Ewers, and Lothar H. Wieler. 2010. “First Insights into Antimicrobial Resistance among Faecal Escherichia Coli Isolates from Small Wild Mammals in Rural Areas.” *The Science of the Total Environment* 408 (17): 3519–22. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2010.05.005>.
 7. Guenther, Sebastian, Torsten Semmler, Annegret Stubbe, Michael Stubbe, Lothar H. Wieler, and Katharina Schaufler. 2017. “Chromosomally Encoded ESBL Genes in Escherichia Coli of ST38 from Mongolian Wild Birds.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (5): 1310–13. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX006>.
 8. Jong, Anno de, Myriam Youala, Ulrich Klein, Farid El Garch, Shabbir Simjee, Hilde Moyaert, Markus Rose, et al. 2021. “Minimal Inhibitory Concentration of Seven Antimicrobials to Mycoplasma Gallisepticum and Mycoplasma Synoviae Isolates from Six European Countries.” <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1861216> 50 (2): 161–73. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1861216>.
 9. Landers, Timothy F., Bevin Cohen, Thomas E. Wittum, and Elaine L. Larson. 2012. “A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential.” *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)* 127 (1): 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>.
 10. Markland, Sarah, Thomas A. Weppelmann, Zhengxin Ma, Shinyoung Lee, Raies A. Mir, Lin Teng, Amber Ginn, et al. 2019. “High Prevalence of Cefotaxime Resistant Bacteria in Grazing Beef Cattle: A Cross Sectional Study.” *Frontiers in Microbiology* 10 (feburay): 176. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00176/BIBTEX>.
 11. Millán, J., G. Aduriz, B. Moreno, R. A. Juste, and M. Barral. 2004. “Salmonella Isolates from Wild Birds and Mammals in the Basque Country (Spain).” *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 23 (3): 905–11. <https://doi.org/10.20506/RST.23.3.1529>.
 12. Musa, Laura, Patrizia Casagrande Proietti, Raffaella Branciani, Laura Menchetti, Sara Bellucci, David Ranucci, Maria Luisa Marenzoni, and Maria Pia Franciosini. 2020. “Antimicrobial Susceptibility of Escherichia Coli and ESBL-Producing Escherichia Coli Diffusion in Conventional, Organic and Antibiotic-Free Meat Chickens at Slaughter.” *Animals : An Open Access Journal from MDPI* 10 (7): 1–12. <https://doi.org/10.3390/ANI10071215>.
 13. Palmgren, H., A. Aspán, T. Broman, K. Bengtsson, L. Blomquist, S. Bergström, M. Sellin, R. Wollin, and B. Olsen. 2006. “Salmonella in Black-Headed Gulls (Larus Ridibundus); Prevalence, Genotypes and Influence on Salmonella Epi-

- demiology.” *Epidemiology and Infection* 134 (3): 635. <https://doi.org/10.1017/S0950268805005261>.
14. Rubini, Silva, Cinzia Ravaioli, Sara Previato, Mario D’Incau, Massimo Tassinari, Enrica Guidi, Silvia Lupi, Giuseppe Meriardi, and Mauro Bergamini. 2016. “Prevalence of Salmonella Strains in Wild Animals from a Highly Populated Area of North-Eastern Italy.” *Annali Dell’Istituto Superiore Di Sanita* 52 (2): 277–80. https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_21.
 15. Salvarani, Felipe Masiero, Rodrigo Otávio Silveira Silva, Prhiscylla Sadanã Pires, Eduardo Coulaud da Costa Cruz Júnior, Isabella Silva Albefaro, Roberto Maurício de Carvalho Guedes, and Francisco Carlos Faria Lobato. 2012. “Antimicrobial Susceptibility of Clostridium Perfringens Isolated from Piglets with or without Diarrhea in Brazil.” *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (3): 1030–33. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300027>.
 16. Seiffert, Salome N., Markus Hilty, Vincent Perreten, and Andrea Endimiani. 2013. “Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Gram-Negative Organisms in Livestock: An Emerging Problem for Human Health?” *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 16 (1–2): 22–45. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2012.12.001>.
 17. Tardón, A., E. Bataller, L. Llobat, and E. Jiménez-Trigos. 2021. “Bacteria and Antibiotic Resistance Detection in Fractures of Wild Birds from Wildlife Rehabilitation Centres in Spain.” *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 74 (February). <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2020.101575>.
 18. “The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017.” 2019. *EFSA Journal* 17 (2). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5598>.
 19. Vogler, Barbara R, Katrin Zurfluh, Prisca Mattmann, Kira Schmitt, Sarah Albin, and Correspondence R Barbara Vogler. 2021. “Low Occurrence of Salmonella Spp. in Wild Birds from a Swiss Rehabilitation Centre.” *Veterinary Record Open* 8 (1): e17. <https://doi.org/10.1002/VRO2.17>.
 20. Wang, Jing, Zhen Bao Ma, Zhen Ling Zeng, Xue Wen Yang, Ying Huang, and Jian Hua Liu. 2017. “The Role of Wildlife (Wild Birds) in the Global Transmission of Antimicrobial Resistance Genes.” *Zoological Research* 38 (2): 55–80. <https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2017.003>.
 21. Wu LJ, Jin HJ, and Xu LP. 2014. “Wu LJ, Jin HJ, Xu LP. 2014. Meta-Analysis on Meropenem and Imipenem/Cilastatin Sodium in the Treatment of Bacterial Infection. *World Notes Antibiotics* 35:28–31.” *World Notes Antibiotics* 35: 28–31. <https://doi.org/10.1128/AAC.00385-20>.
 22. Yagci, B B, N Ocal, S Yasa Duru, and M Akyol. n.d. “The Efficacy of a Combination of Azithromycin and Toltrazuril for the Treatment of Calves Naturally Infected with Cryptosporidiosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Comparative Clinical Trial.” *Original Paper Veterinarni Medicina* 62 (06): 308–14. <https://doi.org/10.17221/125/2015-VETMED>.

CAMPYLOBACTER JEJUNI E CAMPYLOBACTER COLI IN VOLATILI SELVATICI: PREVALENZA E RESISTENZA ANTIMICROBICA

Casalino G., D'Amico F., Napoletano V., Camarda A., Bove A., Dimuccio M.M., Dinardo F.R., Lombardi R., D'Onghia F., Circella E.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, S.P. Casamassima km. 3, 70010 Valenzano (BA), Italia

Summary

Some consequent events to human activities such as the reduction of natural habitats and the climate changes cause difficulties for wildlife leading wild animals to be recovered to wildlife rescue centres. Considering that wildlife may be carrier for microorganisms that may cause disease in humans, in wildlife management it is important to monitor the potential pathogens for humans other than focus on therapeutic treatments to reintroduce the animals into the wild. The aim of this study was to investigate the presence of *C. jejuni* and *C. coli*, which are responsible for enteric syndromes and sometimes extraintestinal diseases in human, in wild birds housed in a wildlife rescue centre. One hundred and thirty-one birds belonging to 17 different species were tested. The sensitivity to the antibiotics was also investigated in the detected strains. *Campylobacter* was found in 41 birds (31,29 %). A higher prevalence of the infection was found in younger in respect to older birds of some species. In addition, the infection rate was higher in birds housed in indoor (60 %) than in outdoor aviaries (45,16 %). Antibiotic resistance was particularly detected against quinolones and trimethoprim/sulfamethoxazole. Multidrug resistance was also found. The results of this study highlight the relevance of increasing the biosecurity to reduce the potential risks for staff involved in wildlife rescue centers.

INTRODUZIONE

Le attività antropiche inducono sugli ecosistemi effetti spesso negativi, come inquinamento e innalzamento delle temperature a livello globale (Harley, 2011; Supple e Shapiro, 2018). Inoltre, l'attività venatoria, soprattutto se non praticata correttamente, mette sotto pressione le popolazioni di animali selvatici in natura. L'eccessivo sfruttamento dei terreni agricoli, spesso adibiti a monocolture, ha portato all'alterazione degli habitat naturali. L'uso dei pesticidi in agricoltura porta ad una riduzione della disponibilità trofica per le specie insettivore oltre che a possibili eventi tossici (Sell et al., 2022). Tutti questi fattori comportano l'affluenza di numerosi esemplari selvatici ritrovati in condizioni di difficoltà presso centri di recupero per la fauna selvatica. In tali centri è importante curare gli animali pervenuti ma anche monitorare agenti potenzialmente patogeni per l'uomo, al fine di tutelare il personale impegnato nelle pratiche riabilitative degli animali. Tra i potenziali patogeni che possono essere veicolati dagli animali vi sono *Campylobacter* (*C. jejuni* e *C. coli*) che, nell'uomo, sono responsabili di sindromi gastroenteriche con dolore addominale, diarrea, nausea e febbre (Skirrow e Blaser, 2000; Moore et al., 2006) ma anche forme extra-intestinali come batteriemia, meningite, pancreatite,

colecistite, nefrite, miocardite, epatite (Blaser e Engberg, 2014). Inoltre, la sindrome di Guillan-Barrè, grave patologia neurologica (Yuki, 2012) e una sua variante, la sindrome di Fisher Miller (Heikema et., 2013), la sindrome di Reiter, una spondiloartropatia (Blaser e Engberg, 2014) sono tutte forme autoimmuni associate a *C. jejuni*. Sebbene il pollame sia uno dei serbatoi più importanti di *Campylobacter* e la campylobacteriosi nell'uomo sia legata prevalentemente al consumo di carne di pollame contaminata (Sahin et al., 2015), gli animali da compagnia (Dipineto et al., 2017) e i selvatici possono esserne portatori (Jurado-Tarifa et al., 2016; Molina-Lopez et al., 2011). Tra le specie selvatiche, *Campylobacter* è stato identificato in mammiferi selvatici, come roditori, cervidi, cinghiali e procioni, ma anche in volatili sia allo stato libero che ospitati presso centri di recupero. Gli obiettivi di questo lavoro sono stati: (i) indagare sulla presenza di *C. jejuni* e *C. coli* tra i volatili selvatici ospitati presso l'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, e (ii) valutare la sensibilità agli antibiotici dei ceppi isolati.

MATERIALI E METODI

Esemplari esaminati e modalità di campionamento

Sono stati analizzati 131 volatili appartenenti a 17 differenti specie (tabella 1), ospitati presso l'Osservatorio Faunistico Regionale (OFR) della Puglia, sito in Bitetto, BA, Italia (per *Campylobacter*). Tutti gli esemplari erano stati precedentemente ricoverati presso il centro prevalentemente perché ritrovati in stato di debilitazione o per lesioni traumatiche, oppure erano stati conferiti come nidiacei o sub-adulti non autosufficienti per poter sopravvivere autonomamente allo stato libero. Gli esemplari erano collocati in voliere esterne o interne.

Tabella 1. Specie ed esemplari di volatili selvatici analizzati nello studio

	Specie	N° esemplari	Età e collocazione delle voliere			
			Immaturo		Adulto	
RAPACI DIURNI	Falco lodolaio (<i>Falco subbuteo</i>)	1	Immaturo: 1		Adulto: 0	
			Est*: 1	Int**: 0	Est: 0	Int: 0
	Sparvierio (<i>Accipiter nisus</i>)	1	Immaturo: 0		Adulto: 1	
			Est: 0	Int: 0	Est: 1	Int: 0
	Gheppio (<i>Falco tinnunculus</i>)	23	Immaturo: 7		Adulto: 16	
			Est: 7	Int: 0	Est: 16	Int: 0
	Falco pellegrino (<i>Falco peregrinus</i>)	3	Immaturo: 0		Adulto: 3	
			Est: 0	Int: 0	Est: 3	Int: 0
	Nibbio reale (<i>Milvus milvus</i>)	3	Immaturo: 0		Adulto: 3	
		Est: 0	Int: 0	Est: 3	Int: 0	
Poiana (<i>Buteo buteo</i>)	17	Immaturo: 0		Adulto: 17		
		Est: 0	Int: 0	Est: 17	Int: 0	
Falco di palude (<i>Circus aeruginosus</i>)	1	Immaturo: 0		Adulto: 1		
		Est: 0	Int: 0	Est: 0	Int: 1	
Biancone (<i>Circetus gallicus</i>)	3	Immaturo: 0		Adulto: 3		
		Est: 0	Int: 0	Est: 3	Int: 3	
Albanella pallida (<i>Circus macrourus</i>)	1	Immaturo: 0		Adulto: 1		
		Est: 0	Int: 0	Est: 1	Int: 0	
RAPACI NOTTURNI	Civetta (<i>Athene noctua</i>)	17	Immaturo: 0		Adulto: 17	
			Est: 0	Int: 0	Est: 17	Int: 0
	Gufo (<i>Asio otus</i>)	31	Immaturo: 25		Adulto: 6	
			Est: 21	Int: 4	Est: 6	Int: 0
Barbagianni (<i>Tyto alba</i>)	7	Immaturo: 0		Adulto: 7		
		Est: 0	Int: 0	Est: 7	Int: 0	
Assiolo (<i>Otus scops</i>)	5	Immaturo: 0		Adulto: 5		
		Est: 0	Int: 0	Est: 3	Int: 2	
SPECIE ONNIVORE	Gazza (<i>Pica pica</i>)	10	Immaturo: 1		Adulto: 9	
			Est: 0	Int: 1	Est: 4	Int: 5
	Ghiandaia (<i>Garrulus glandarius</i>)	5	Immaturo: 1		Adulto: 4	
			Est: 1	Int: 0	Est: 4	Int: 0
Taccola (<i>Coloeus monedula</i>)	1	Immaturo: 0		Adulto: 1		
		Est: 0	Int: 0	Est: 1	Int: 0	
Cornacchia (<i>Corvus cornix Linnaeus</i>)	2	Immaturo: 0		Adulto: 2		
		Est: 0	Int: 0	Est: 2	Int: 0	

*Est= voliera esterna; **Int: voliera interna al ricovero

Per ciascun volatile è stato effettuato un tampone cloacale. La raccolta dei campioni è stata eseguita secondo le linee guida del Comitato Etico per la Sperimentazione Animale del Dipartimento di Medicina Veterinaria (DiMeV) dell'Università degli Studi di Bari.

Isolamento e identificazione di Campylobacter

I campioni sono stati posti in brodo di arricchimento selettivo per *Campylobacter* (OXOID), arricchito con il 5% di sangue di pecora, *Campylobacter* Selective Supplement (SR0085E) (OXOID) e *Campylobacter* Growth Supplement (SR0232) (OXOID), e incubati a 42° C in microaerofilia per 24 ore. Successivamente sono stati ripassati su *Campylobacter* agar base (CM0689, OXOID), arricchito con sangue di pecora (5%), con l'aggiunta di selettivo (*Campylobacter* Selective Supplement-SR0098E, OXOID) e *Campylobacter* Growth Supplement-(SR0232-OXOID), e incubati nelle stesse condizioni per 48-72 ore. Le colonie morfologicamente compatibili con *Campylobacter* spp. sono state trasferite su agar sangue. Tre colonie per campione sono state individualmente identificate mediante estrazione del DNA con trattamento termico a 95° C per 10 minuti in termociclatore (Mastercycler EP-Gradient, Eppendorf) e multiplex-PCR (con primers di genere *Campylobacter* e specie *C. jejuni* e *C. coli*), secondo Denis et al. (1999) con lievi modifiche nel protocollo termico. I ceppi identificati sono stati conservati a -80° C in brodo BHI (Brain Heart Infusion) e glicerolo, per le successive prove di sensibilità *in vitro* agli antibiotici.

Test di sensibilità agli antibiotici

Ad esclusione di un singolo ceppo riscontrato in un gufo, tutti i ceppi di *Campylobacter* identificati sono stati sottoposti a test di sensibilità nei confronti di: azitromicina 15 µg; cloramfenicolo 30 µg; ciprofloxacina 5 µg; enrofloxacina 5 µg; eritromicina 15 µg; gentamicina 10 µg; nalidixico acido 30 µg; tetraciclina 30 µg; e trimetoprim-sulfametossazolo 25 µg. I test di sensibilità agli antibiotici sono stati eseguiti su agar Muller-Hinton arricchito con il 5% di sangue secondo il metodo standard di diffusione su disco di Kirby – Bauer (EUCAST, 2022).

RISULTATI

Riscontro di C. jejuni e C. coli

Campylobacter è stato identificato in 41 su 131 uccelli selvatici (31,29%). La specie più presente tra gli animali è stata *C. jejuni*, identificato in 38 (29 %) mentre *C. coli* è stato isolato solo nei gufi, in 3 esemplari (2,29 %).

Campylobacter è stato trovato particolarmente tra le specie onnivore (72,22%). Tra i rapaci, il tasso di infezione da *Campylobacter* era rispettivamente del 11,32 e del 36,67 % negli esemplari diurni e notturni. Il gheppio, con 6 individui positivi su 23 analizzati, è risultata l'unica specie interessata dall'infezione nel gruppo dei rapaci diurni. Tra le specie notturne, il gufo comune è stato il rapace più frequentemente interessato, con 14 esemplari positivi su 31 testati (45,16%). *Campylobacter* è stato identificato in 6 civette su 17 (35,29%) e in 2 assioli su 5 (40%) mentre i barbagianni sono risultati tutti negativi.

Tabella 2. Prevalenza di *Campylobacter* nelle diverse specie di volatili selvatici presso l'OFR

	<i>Specie</i>	<i>N° positivi/ N° testati</i>	<i>Tasso di positività (%)</i>
Rapaci diurni	Falco lodolaio (<i>Falco subbuteo</i>)	0/1	0
	Sparviero (<i>Accipiter nisus</i>)	0/1	0
	Gheppio (<i>Falco tinnunculus</i>)	6/23	26.09
	Falco pellegrino (<i>Falco peregrinus</i>)	0/3	0
	Nibbio reale (<i>Milvus milvus</i>)	0/3	0
	Poiana comune (<i>Buteo buteo</i>)	0/17	0
	Falco di palude (<i>Circus aeruginosus</i>)	0/1	0
	Biancone (<i>Circetus gallicus</i>)	0/3	0
	Albanella pallida (<i>Circus macrourus</i>)	0/1	0
	Sub-totale	6/53	11.32
Rapaci notturni	Civetta (<i>Athene noctua</i>)	6/17	35.29
	Gufo comune (<i>Asio otus</i>)	14/31	45.16
	Barbagianni (<i>Tyto alba</i>)	0/7	0
	Assiolo comune (<i>Otus scops</i>)	2/5	40
		Sub-totale	22/60
Specie onnivore	Gazza eurasiatica (<i>Pica pica</i>)	6/10	60
	Ghiandaia (<i>Garrulus glandarius</i>)	5/5	100
	Taccola (<i>Coloeus monedula</i>)	1/1	100
	Cornacchia grigia (<i>Corvus cornix Linnaeus</i>)	1/2	50
		Sub-totale	13/18
	TOTALE	41/131	31,29

Per le specie in cui è stato possibile effettuare un confronto, *Campylobacter* è stato rilevato prevalentemente negli animali collocati nelle voliere interne (60,00%) rispetto a quelli all'aperto (45,16%) (Tabella 2).

Tabella 3. Riscontro di *Campylobacter* in base alla collocazione dei volatili

<i>Specie</i>	VOLIERE INTERNE		VOLIERE ESTERNE	
	N° pos/N° testati	%	N° pos/N° testati	%
Gufo (<i>Asio otus</i>)	3/4	75	11/27	40,74
Gazza (<i>Pica pica</i>)	3/6	50%	3/4	75
TOTAL	6/10	60	14/31	45,16

In base all'età, per le specie in cui è stato possibile fare questo confronto, il tasso di infezione tra i gufi era simile sia nei giovani (44%) che negli adulti (50%), mentre risultava più alto negli esemplari di gheppio immaturi (42,86%) rispetto agli adulti (18,75%) (Tabella 3).

Tabella 4. Riscontro di *Campylobacter* in base all'età dei volatili

Specie	IMMATURI		ADULTI	
	N° pos/N° testati	%	N° pos/N° testati	%
Gufi	11/25	44	3/6	50
Gheppi	3/7	42.86	3/16	18.75
Totale	14/32	43,75	6/22	27,27

Resistenza antimicrobica di C. jejuni e C. coli

Tra i ceppi di *C. jejuni*, 21 (56,8%), 14 (37,8%) e 9 (24,3%) erano resistenti rispettivamente a trimetoprim/sulfametossazolo, ciprofloxacina ed enrofloxacin (Tabella 4). Quattro ceppi (10,8%) erano resistenti all'acido nalidixico e 5 (13,5%) alla tetraciclina. Inoltre, uno e 2 ceppi di *C. jejuni* erano resistenti rispettivamente all'eritromicina e all'azitromicina. Analoghe resistenze nei confronti degli stessi antibiotici sono state individuate nei ceppi di *C. coli*, ad eccezione dell'eritromicina. Nessun ceppo di *Campylobacter* testato è risultato resistente al cloramfenicolo e alla gentamicina.

Tabella 5. Resistenza agli antibiotici di *C. jejuni* (37) e *C. coli* (3)

		N° stipiti resistenti/N° analizzati (%)		
	Molecole	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Totale
Macrolidi	<i>Azitimicina</i>	2/37 (5,4)	1/3 (33,3)	3/40 (7,5)
	<i>Eritromicina</i>	1/37 (2,7)	0/3 (0)	1/40 (2,5)
	<i>Chloramfenicolo</i>	0/37 (0)	0/3 (0)	0/40 (0)
Chinoloni	<i>Ciprofloxacina</i>	14/37 (37,8)	2/3 (66,7)	16/40 (40)
	<i>Enrofloxacin</i>	9/37 (24,3)	1/3 (33,3)	10/40 (25)
	<i>Acido nalidixico</i>	4/37 (10,8)	2/3 (66,7)	6/40 (15)
Tetraciclina	<i>Tetraciclina</i>	5/37 (13,5)	3/3 (100)	8/40 (20)
Aminoglicosidi	<i>Gentamicina</i>	0/37 (0)	0/3 (0)	0/40 (0)
Sulfonamidi	<i>Trimetoprim/Sulfametossazolo</i>	21/37 (56,8)	2/3 (66,7)	23/40 (57,5)

Nella tabella 6 sono riportati i risultati relativi al riscontro di multi-resistenze nei confronti di più molecole evidenziate nei ceppi di *Campylobacter* analizzati.

Tabella 6. Multi-resistenze riscontrate in *C. jejuni* e *C. coli*

N° molecole	Associazione molecole	<i>C. jejuni</i> (37)	<i>C. coli</i> (3)	Totale (40)
2	Cipro/Enro	0/37 (0)	0/3 (0)	0/40 (0)
	Cipro/Sulfa	3/37 (8.1)	0/3 (0)	3/40 (7.5)
	Ac.Nalid/Sulfa	1/37 (2.7)	0/3 (0)	1/40 (2.5)
	Tetra/Sulfa	1/37 (2.7)	0/3 (0)	1/40 (2.5)
3	Cipro/Enro/Ac.Nal	0/37 (0)	0/3 (0)	0/40 (0)
	Cipro/Enro/Sulfa	6/37 (16.21)	0/3 (0)	6/40 (15)
	Cipro/Ac.Nal/Sulfa	1/37 (2.7)	0/3 (0)	1/40 (2.5)
	Azitra/Eritro/Tetra	1/37 (2.7)	0/3 (0)	1/40 (2.5)
4	Cipro/Ac.Nal/Tetra/Sulfa	1/37 (2.7)	1/3 (33,33)	2/40 (5)
	Cipro/Enro/Ac.Nal/Sulfa	0/37 (0)	0/3 (0)	0/40 (0)
	Azitra/Cipro/Enro/Sulfa	1/37 (2.7)	0/3 (0)	1/40 (2.5)
5	Cipro/Enro/Ac.Nal/Tetra/Sulfa	1/37 (2.7)	0/3 (0)	1/40 (2.5)
6	Azitra/Cipro/Enro/Ac.Nal/Tetra/Sulfa	0/37 (0)	1/3 (33,33)	1/40 (2.5)

DISCUSSIONE

Campylobacter è stato riscontrato nel 31,29% dei volatili selvatici analizzati nel centro faunistico, con la prevalenza di *C. jejuni* che rappresenta la specie principalmente associata alla campylobacteriosi nell'uomo (Janssen et al., 2008). Questo risultato è rilevante se si considera che i volatili infetti erano portatori asintomatici che possono potenzialmente trasferire più facilmente l'agente patogeno al personale coinvolto nella gestione degli animali. La prevalenza di *C. jejuni* rispetto a *C. coli* e altre specie di *Campylobacter* è stata riportata in altri studi condotti in centri di recupero (Dipineto et al., 2014; Gargiulo et al., 2018; Molina-Lopez et al., 2011) e in uccelli selvatici allo stato libero (Hald et al., 2016). Nel nostro studio non sono state rilevate altre specie di *Campylobacter* nei volatili testati, avendo adottato una multiplex-PCR in grado di individuare specie diverse da *C. jejuni* e *C. coli* attraverso i primers di genere. Allo stesso modo, nessun'altra specie è stata rilevata in centri di recupero italiani (Dipineto et al., 2014; Gargiulo et al., 2018), mentre in Spagna *C. lari* è stato identificato in un gufo comune (Molina-Lopez et al., 2011).

Nel nostro studio è stata osservata una diversa distribuzione dell'incidenza dell'infezione che è risultata particolarmente elevata nelle specie onnivore (72,22%). Tra i rapaci, è stata invece pari all'11,32% nei diurni e 36,67% nei notturni. Studi analoghi condotti su rapaci ospitati in centri di recupero hanno evidenziato positività pari a 36,9% (Dipineto et al., 2014) e 39,1% (Gargiulo et al., 2018) nelle specie diurne, e 13,9% (Dipineto et al., 2014) e 18,6% (Gargiulo et al., 2018) in quelle notturne. Il tasso di infezione è risultato inferiore e pressoché sovrapponibile tra i rapaci diurni (7,22%) e notturni (7,89%) ospitati in un centro faunistico in Spagna (Molina-Lopez et al., 2011). Sebbene possa essere correlata a una diversa situazione epidemiologi-

ca, questa minore prevalenza potrebbe essere dovuta anche al diverso metodo di laboratorio utilizzato per ricercare il germe. Infatti, nella ricerca spagnola, i campioni sono stati seminati direttamente su terreni solidi selettivi senza l'utilizzo di un arricchimento in brodo che è invece previsto nelle procedure di screening per l'isolamento di *Campylobacter* da campioni biologici. Uno dei fattori che potrebbe aver influenzato le diverse prevalenze di *Campylobacter* nei gruppi di volatili considerati in questo studio può essere rappresentato dalle abitudini alimentari, anche se nei centri faunistici, pur rispettando le esigenze nutrizionali di ciascuna specie, l'alimentazione degli animali appartenenti a specie diverse è più uniforme rispetto a quanto avviene in ambiente naturale. I rapaci notturni hanno una dieta prevalentemente composta da arvicole, topi, ratti e talpe; gufi e civette tendono a predare anche uccelli, piccoli rettili, pipistrelli, e, soprattutto le civette, falene e insetti; i barbogianni hanno una dieta più strettamente legata ai roditori, che possono veicolare *Campylobacter* soprattutto se vivono in aree urbane e si nutrono di rifiuti (Meerburg e Kijlstra, 2007). Tuttavia, la negatività riscontrata in questa specie potrebbe essere legata agli individui testati che, essendo esemplari irrecuperabili, vivono da anni nel centro faunistico e sono alimentati da lungo tempo prevalentemente con cibo congelato. Per la positività riscontrata negli assioli, la cui dieta naturale è prevalentemente composta da insetti, non si possono escludere possibili contatti anche indiretti con individui positivi appartenenti ad altre specie presenti nel centro.

Per quanto riguarda l'età degli animali, nei gheppi *Campylobacter* è stato riscontrato prevalentemente nei giovani. Gli adulti hanno solitamente nella loro vita più possibilità di entrare in contatto con il germe attraverso diverse potenziali fonti di contaminazione. Il più alto tasso di positività rilevato nei giovani gheppi potrebbe essere probabilmente legato a contaminazioni crociate dovute ai frequenti contatti reciproci nella nursery interna alla struttura. Analogamente, il tasso di infezione più elevato nei soggetti collocati nei ricoveri interni, rispetto agli individui gestiti all'aperto che sono più esposti a roditori o uccelli che vivono allo stato libero, può essere dovuto all'ambiente più confinato che favorisce contatti diretti e indiretti più frequenti tra gli animali.

Per quanto attiene alla resistenza antimicrobica dei ceppi di *Campylobacter* isolati, sono state evidenziate percentuali di resistenza non trascurabili nei confronti dei chinoloni e di trimetoprim/sulfametossazolo. I chinoloni sono gli antibiotici più frequentemente utilizzati in medicina veterinaria e, per la campylobacteriosi, in medicina umana sono considerati un valido trattamento alternativo ai macrolidi (García-Fernández et al., 2018). Trimetoprim/sulfametossazolo è l'associazione farmacologica più frequentemente utilizzata in caso di sindromi enteriche nell'uomo. La resistenza all'azitromicina, molecola utilizzata piuttosto di recente in medicina umana, è stata evidenziata sia in *C. jejuni* che *C. coli*. Inoltre, una percentuale non trascurabile di ceppi risultava resistente a 3 o più molecole antibiotiche.

CONCLUSIONI

La presenza di *C. jejuni* e *C. coli* nei volatili selvatici del centro faunistico evidenzia l'importanza di incrementare le misure di biosicurezza, soprattutto se si considera che l'infezione non viene sospettata in quanto decorre di solito in forma asintomatica

negli animali e che i ceppi analizzati presentano alcune resistenze ai farmaci. Le resistenze antimicrobiche, considerata la possibilità che possano trasferirsi da una specie batterica all'altra, possono portare inoltre a possibili difficoltà in caso di terapie in soggetti malati o feriti, ricoverati nei centri di recupero.

BIBLIOGRAFIA

1. Harley CD. (2011). Climate Change, Keystone Predation, and Biodiversity Loss. *Science*. 334: 1124–1127.
2. Supple MA, Shapiro B. (2018). Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biol*. 19: 1–12.
3. Sell B, Sniegocki T, Giergiel M, Posyniak A. (2022). White-Tailed Eagles' (*Haliaeetus albicilla*) Exposure to Anticoagulant Rodenticides and Causes of Poisoning in Poland (2018–2020). *Toxics*. 10: 63.
4. Skirrow MB, Blaser MJ. (2000). Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In I. Nachamkin I, Blaser MJ (Eds). *Campylobacter*, ASM Press, Washington, DC, pp. 69–88.
5. Moore JE, Barton MD, Blair IS, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Kempf I, Lastovica AJ, Lowery CJ, Matsuda M et al. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect*. 8:1955–196.
6. Blaser MJ, Engberg J. (2014). Clinical Aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Infections. *Campylobacter*, 97–121.
7. Yuki N, Hartung HP. (2012). Guillain–Barré Syndrome. *N. Engl. J. Med*. 366: 2294–2304.
8. Heikema AP, Jacobs BC, Horst-Kreft D, Huizinga R, Kuijf ML, Endtz HP, Samsom JN, van Wamel WJ. (2013). Siglec-7 specifically recognizes *Campylobacter jejuni* strains associated with oculomotor weakness in Guillain–Barré syndrome and Miller Fisher syndrome. *Clin. Microbiol. Infect*. 19: E106–E112.
9. Sahin O, Kassem II, Shen Z, Lin J, Rajashekara G, Zhang Q. (2015). *Campylobacter* in Poultry: Ecology and Potential Interventions. *Avian Dis*. 59: 185–200.
10. Dipineto L, Borrelli L, Pace A, Romano V, D'Orazio S, Varriale L, Russo TP, Fioretti A. (2017). *Campylobacter coli* infection in pet birds in southern Italy. *Acta Vet*. 59:1-3.
11. Jurado-Tarifa E, Torralbo A, Borge C, Cerdà-Cuèllar M, Ayats T, Carbonero A, García-Bocanegra I. (2016). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* strains isolated from decoys and raptors. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 48:14–21.
12. Molina-Lopez RA, Valverdù N, Martín M, Mateu E, Obon E, Cerdà-Cuèllar M, Darwich L. (2011). Wild raptors as carriers of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* strains. *Vet. Rec*. 168:565.
13. Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G, Colin P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. App. Microbiol*. 29: 406–410.
14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST clinical breakpoint table. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
15. Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA., van Pelt W, Wagenaar JA, Owen RJ. (2008). Host-Pathogen Interactions in *Campylobacter* Infections: the Host Perspective. *Clin. Microbiol. Rev*. 21: 505–518.

16. Dipineto L, De Luca Bossa LM, Russo TP, Cutino EA, Gargiulo A, Ciccarelli F, Raia P, Menna F, Fioretti, A. (2014). *Campylobacterspp. and Birds of Prey. Avian Diseases. 58: 303–305.*
17. Gargiulo A, Fioretti A, Russo TP, Varriale L, Rampa L, Paone S, De Luca Bossa LM, Raia P, Dipineto L. (2018). Occurrence of enteropathogenic bacteria in birds of prey in Italy. *App. Microbiol. 66: 202–206.*
18. Hald B, Skov MN, Nielsen EM, Rahbek C, Madsen JJ., Waino M, Chriél M, Nordentoft S, Baggesen DL, Madsen M. (2016). *Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in wild birds on Danish livestock farms. Acta. Vet. Scand. 58:11.*
19. Meerburg BG, Kijlstra A. (2007). *Role of rodents in transmission of Salmonella and Campylobacter. J. Sci. Food Agri. 87: 2774–2781.*
20. García-Fernández A, Dionisi AM, Arena S, Iglesias-Torrens Y, Carattoli A, Luzzi I. (2018). Human *Campylobacteriosis* in Italy: Emergence of Multi-Drug Resistance to Ciprofloxacin, Tetracycline, and Erythromycin. *Front. Microbiol. 9:1-8.*

UTILIZZO DELL'ASSOCIAZIONE ATOVAQUONE/PROGUANILE CLO- RIDRATO PER IL TRATTAMENTO DELLA MALARIA AVIARE NELLE CIVETTE DELLE NEVI (*BUBO SCANDIACUS*)

Samarelli R.¹, Pugliese N.¹, Lombardi R.^{1,2}, Schiavone A.¹, Circella E.¹, Saleh M.^{1,3}, Cafiero M.⁴, Raelo D.⁴, Siddique I.¹, Camarda A.^{1,2}

¹Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Dipartimento di Medicina Veterinaria, S.P. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (Bari), Italia

²Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, Via Generale Palmiotti Michele 43, 70020 Bitetto (Bari), Italia.

³Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, via Manfredonia

Summary

Avian malaria is an ubiquitous disease affecting avian species worldwide, caused by parasites belonging to the genus *Plasmodium* (Apicomplexa: *Haemosporida*), and transmitted by *Culicidae* mosquitoes. Within the *Plasmodium* genus, *Plasmodium relictum* is one of the most diffused species.

The disease is characterized by great variability in the effects on the infected birds. Despite the increasing detection of *Plasmodium* spp. infection in birds, and the potentially deleterious effects it may generate in hosts, little knowledge about treatments is available to date.

In human medicine atovaquone/proguanil hydrochloride is one of the most used drugs for the treatment of malaria.

Therefore, the present study is aimed to report the efficacy of treatment with atovaquone/proguanil hydrochloride (AV/PG) administered to three captive-bred snowy owls (*Bubo scandiacus*) housed in a wildlife rescue center in Apulia, Italy, affected by avian malaria.

The AV/PG combination at a dosage of 10.5/4.2 mg/kg was orally administered once a day for three days. After a break of one week, another 3 days treatment course was administered. Blood was collected from the birds at 7, 30, and 60 days after the last AV/PG administration to assess the effectiveness of the treatment and disclose potential relapse.

The hematological parameters were measured before treatments and concurrently with the monitoring period.

No positivity to the parasite was detected until 60 days after the end of the treatment, and no deleterious effect was seen during the observation period.

The presented results suggest that the combination of AV/PG can be used effectively to treat avian malaria by *P. relictum*. Additionally, they provide a dosage that can be safely administered to such valuable birds.

INTRODUZIONE

La malaria aviare è una delle malattie emergenti nell'ambito dell'avifauna selvatica, che potrebbe avere un impatto negativo sul benessere delle popolazioni di uccelli

selvatici detenuti in cattività.

La malattia è sostenuta da parassiti appartenenti al genere *Plasmodium* (Apicomplexa: *Haemosporida*), ed è trasmessa da vettori. Sebbene diverse specie di zanzare appartenenti alla famiglia *Culicidae* siano ritenute vettori del parassita, *Culex pipiens* sembrerebbe essere la specie maggiormente coinvolta nella trasmissione dei plasmodi aviari e nel loro ciclo biologico [1-2]. Anche alla luce dei cambiamenti climatici, che favoriscono la diffusione e la persistenza dei vettori, la malattia ha diffusione pressoché ubiquitaria, ad eccezione per le regioni artiche ed antartiche [3-4]. Ad oggi, si ritiene che siano almeno 55 le specie di plasmodi in grado di indurre la malaria aviare negli uccelli [4]. Tra queste, *Plasmodium relictum* è la più diffusa [5]. Infatti, sono circa 220 le specie di uccelli che possono essere infettate da uno dei 5 principali genotipi di questo parassita, ovvero SGS1, GRW11, GRW4, LZFS01 e PHCOL01 [4].

Gli uccelli infetti possono manifestare un quadro clinico ampio e variegato, che può variare in funzione della specie colpita e di una serie di fattori, alcuni dei quali tuttora sconosciuti [6-7].

Quale sia l'impatto reale della malaria aviare negli uccelli selvatici liberi in natura non è ben noto. Sono scarsi, infatti, i lavori scientifici di tipo epidemiologico sull'argomento. Ben diversa sembra la situazione nei centri di recupero o negli zoo, dove è noto che la circolazione del parassita può influire pesantemente sulla salute degli animali con grave impatto sulla qualità della vita [8]. La crescente diffusione della malaria aviare e la conseguente attenzione nei suoi confronti [9], ad oggi non hanno determinato la messa a punto di un protocollo terapeutico ben definito di cui sia stata dimostrata l'efficacia a lungo termine. Le informazioni disponibili in letteratura riportano, infatti, una varietà di trattamenti che spesso, però, si sono dimostrati poco efficaci o, in alcuni casi, tossici in alcune specie di uccelli detenuti in cattività [10-11].

In medicina umana, l'associazione farmacologica di atovaquone (AV) e proguanile cloridrato (PG) è tra le più utilizzate nel trattamento della malaria. Entrambe le sostanze sono attive sullo stadio intraeritrocitario del parassita. Nello specifico, l'atovaquone esplica un'azione schizonticida e gametocitocida inibendo il trasporto di elettroni all'interno delle cellule mitocondriali dell'organismo parassita. Il proguanile cloridrato, invece, esplica sia un'azione schizonticida nell'ospite, che di inibitore dello sviluppo delle oocisti all'interno del vettore, andando ad inibire la produzione dei folati necessaria per la sintesi del DNA parassitario. Quest'ultima molecola ha effetto sinergico sull'azione dell'atovaquone, incrementando così l'efficacia del farmaco [12].

Alla luce di tali osservazioni, con il presente studio si è inteso valutare l'efficacia dell'associazione atovaquone/proguanile cloridrato per il trattamento di tre esemplari di civette delle nevi (*Bubo scandiacus*) affette da malaria aviare, ospitate presso l'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia.

MATERIALI E METODI

Descrizione del caso

Tre civette delle nevi (*Bubo scandiacus*), detenute presso l'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, hanno manifestato sintomatologia clinica aspecifica con anoressia o disoressia, perdita di peso e sanguinamento prolungato a seguito di lesioni accidentali.

I tre soggetti, due maschi e una femmina, avevano un'età compresa tra 5 e 10 anni e peso di circa 1,5 Kg ciascuno. Il loro regime alimentare era costituito da prede vive e alimento congelato rappresentato da colli di pollo, topi e pulcini. Gli animali erano ospitati in voliere all'aperto, costituite da un fondo in muratura e una rete a maglia media sui restanti tre lati della struttura, adiacenti ad altre voliere che ospitavano differenti specie di avifauna. Nonostante la presenza delle reti, la possibilità di contatto degli uccelli con i vettori non era impedita.

A seguito dell'insorgenza dei segni clinici sopra indicati, lo staff veterinario decideva di sottoporre i tre esemplari ad indagini ematologiche e screening per le principali malattie infettive ascrivibili alla sintomatologia manifestata.

Indagini batteriologiche e molecolari

Tutti e tre gli esemplari sono stati sottoposti a indagini per escludere alcune malattie infettive batteriche compatibili con la sintomatologia osservata. Sono stati raccolti, pertanto, campioni di feci per la valutazione della presenza di parassiti intestinali mediante flottazione fecale, oltre che tamponi cloacali e tracheali da sottoporre a esami batteriologici ad ampio spettro [13-14].

Indagini ematologiche

I tre soggetti sono stati sottoposti a prelievo di sangue per la valutazione dei parametri emocromocitometrici e biochimici completi. Lo screening è stato eseguito a T0 (momento della diagnosi) e a T7, T30 e T60 (rispettivamente una settimana, 30 giorni e 60 giorni dopo la fine della somministrazione del farmaco).

Il sangue, nella quantità di 1,5 ml totali, è stato prelevato dalla vena ulnare di ciascun soggetto utilizzando una siringa sterile da 2,5 ml. Del sangue raccolto, 1 ml è stato stoccato in provette per siero con gel separatore (Vacumed® Gel Separator + Cloth Activator), mentre 500 mL sono stati stoccati in provette contenenti litio eparina (Microvette® 500, Litio Eparina, Sarstedt). Il sangue è stato conservato a temperatura di refrigerazione fino alla consegna presso un laboratorio esterno, entro 12 ore dal prelievo.

Ricerca e identificazione dell'emoparassita

Per la diagnosi di malaria aviare, è stata effettuata la purificazione del DNA genomico totale a partire da 30 uL di sangue intero in litio eparina, mediante l'utilizzo del kit ZymoBIOMICS® DNA Miniprep (Zymo Research Corporation, USA), secondo le istruzioni fornite dal produttore. La ricerca degli emoprotozoi è stata effettuata mediante nested-PCR, come precedentemente descritto [15-16]. L'indagine molecolare per la ricerca di emoparassiti dal sangue è stata eseguita in tutte le fasi del campionamento, ovvero a T0, T7, T30 e T60 al fine di verificare l'eventuale persistenza dell'infezione.

Per l'identificazione del parassita, l'amplicone ottenuto è stato purificato mediante l'utilizzo del PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) e successivamente sequenziato, mediante metodica Sanger, presso le strutture del Microsynth SeqLab (Göttingen, Germania). Per il sequenziamento sono stati utilizzati i primer HAEMF (5'-ATGGTGCTTTC-GATGATCATG-3') e HAEMR2 (5'-GCATTATCTGGATGTATAATGGT-3') [16]. L'analisi dei nucleotidi relativi alle sequenze ottenute è stata condotta con l'ausilio del CLC Sequence Viewer (CLC Bio, Aarhus, Danimarca).

Le sequenze sono state assemblate con l'ausilio del programma online Cap3 Sequence Assembly Program [17] e la sequenza nucleotidica ottenuta è stata confrontata mediante il software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) con quelle disponibili in GenBank.

Quantificazione molecolare di Plasmodium relictum

Sui campioni risultati positivi è stata messa a punto una qPCR per la quantificazione del parassita nel sangue, disegnando i primers CytbqF (5'-CCTTTAGGGTATGATACAG-3') e CytbqR (5'TTCTGGAACAATATGTAAAGG-3'), e la sonda CytbqP (5'FAM-AAATACCCTTCTATCCAAATCT-3').

Il risultato finale della qPCR è stato espresso in numero di plasmodi per mL di sangue, sulla base del volume di DNA eluito (75 mL) e del volume di DNA utilizzato (2 mL), e normalizzato secondo le informazioni reperibili in letteratura [18], è stata effettuata al momento della diagnosi e successivamente a 7, 30 e 60 giorni dal termine della terapia farmacologica.

Somministrazione di atovaquone/proguanile cloridrato: dosaggio e protocollo terapeutico

Ai soggetti positivi è stata somministrata la combinazione AV/PG 10,5 e 4,2 mg/kg, rispettivamente, in singola somministrazione giornaliera per via orale. Il dosaggio è stato definito adattando i dati disponibili in letteratura [19-20], applicando il criterio del miglior rapporto benefici/rischi, cercando quindi di utilizzare la minima dose efficace.

Il piano terapeutico prevedeva due cicli di somministrazione del farmaco della durata di tre giorni, con un intervallo terapeutico di 7 giorni tra un ciclo e l'altro.

Approvazione del comitato etico

Il progetto di ricerca è stato sottoposto e valutato dal comitato etico del Dipartimento di Medicina Veterinaria che ha espresso parere favorevole (n. 12/2022) alla sua esecuzione.

RISULTATI

Esiti diagnostici ed indagini ematologiche

Tutti e tre i soggetti sono risultati negativi sia per parassiti intestinali che per *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida*.

Di contro, tutti e tre i soggetti sono risultati positivi, in nested-PCR, per la ricerca di emoparassiti. Il successivo sequenziamento ha consentito l'identificazione di *Plasmodium relictum*, agente causale della malaria aviaria.

Dalle indagini emocromocitometriche e biomolecolari, nessuna fluttuazione di rilievo dei parametri ematici è stata evidenziata in tutti e tre i soggetti, sia al momento della diagnosi (T0) che a 7, 30 e 60 giorni dal termine della terapia (T7-T30-T60). Dopo il trattamento, si è avuta la scomparsa dei segni clinici senza alcuna recidiva per tutta la durata del monitoraggio.

Quantificazione molecolare di Plasmodium relictum

La curva standard della qPCR ha restituito un'efficienza del 94,5% ed un R^2 pari a 0,999 supportando, così, l'attendibilità dei risultati ottenuti.

La quantificazione del parassita nel sangue ha consentito di evidenziare, al momento della diagnosi, una carica compresa tra $2,99 \times 10^2$ e $4,36 \times 10^3$ plasmodi/mL di sangue (Tab. 1).

Nelle fasi di monitoraggio, già a 7 giorni dal termine della terapia, uno dei tre soggetti è risultato negativo, mentre i restanti due hanno mostrato un brusco abbattimento della carica parassitaria. A 30 giorni e a 60 giorni dal termine della terapia, invece, tutti e tre i soggetti sono risultati negativi (Tab 1).

Tabella 1. Carica di plasmodio rilevata mediante qPCR nel sangue delle civette al momento della diagnosi e durante il monitoraggio.

Soggetto	T0 (N° cell/mL sangue)	T7 (N° cell/mL sangue)	T30 (N° cell/mL sangue)	T60 (N° cell/mL sangue)
Civetta F	$2,99 \times 10^2$	$1,14 \times 10^{-1}$	ND	ND
Civetta M1	$4,36 \times 10^3$	ND	ND	ND
Civetta M2	$7,46 \times 10^2$	$1,62 \times 10^{-1}$	ND	ND

DISCUSSIONE

Le indagini diagnostiche effettuate sui tre esemplari di Civetta delle nevi hanno evidenziato una positività per *P. relictum*, agente responsabile della malaria aviare, mettendo in luce la circolazione del parassita e, presumibilmente, del vettore all'interno del centro di recupero.

La negativizzazione nei confronti del patogeno e la concomitante scomparsa del quadro clinico a seguito del trattamento terapeutico hanno dimostrato l'efficacia della combinazione farmacologica utilizzata, dato supportato dalla quantificazione molecolare effettuata sui tre soggetti. Contestualmente, i valori emocromocitometrici e biochimici non mostravano oscillazioni di rilievo, segno che il trattamento non ha causato sofferenze epatiche, renali o di altro tipo.

Tale risultato non è da sottovalutare, in quanto dimostra la disponibilità di un trattamento sicuro ed efficace per il controllo della malaria aviare utile a contrastare un problema sanitario sempre più pressante. Infatti, centri di recupero e strutture zoologiche spesso ospitano specie, quali le civette delle nevi o gli sfeniscidi che, a causa di una mancata coevoluzione con il parassita, manifestano una spiccata sensibilità nei confronti della malattia [19-21]. A complicare il quadro si aggiungono le difficoltà di controllo del vettore in molte di queste strutture, e la crescente diffusione della malattia anche tra gli animali selvatici.

Sebbene in letteratura siano descritti diversi studi condotti su varie specie, come ad esempio i passeriformi [20], e vengano proposti differenti protocolli terapeutici [10], le informazioni a disposizione sono spesso lacunose, i dosaggi sono talora empirici, approssimativi o addirittura eccessivamente alti, per via delle normative che impediscono di implementare studi farmacologici sulle specie selvatiche e protette. Infine, alcune delle sostanze usate hanno evidenziato effetti tossici di rilievo [11].

In ambito umano, invece, le alternative terapeutiche per il trattamento della malaria sono numerose e ampiamente sperimentate. Uno dei trattamenti farmacologici

di maggiore impiego negli scorsi decenni per la cura della Malaria umana è rappresentato dall'associazione AV/PG [12]. Il trattamento ha restituito per anni ottimi risultati con effetti collaterali non particolarmente marcati, sebbene ad oggi il suo utilizzo sia ridotto a causa dell'insorgenza di resistenze al farmaco da parte di alcune popolazioni di plasmodi [22].

CONCLUSIONI

Questo studio ha cercato di compendiare le informazioni disponibili in ambito medico umano e veterinario in modo da proporre un trattamento con AV/PG efficace e sicuro nel trattamento della malaria aviaria nelle civette delle nevi. Si rendono necessarie, ad ogni modo, ulteriori indagini per la valutazione dell'efficacia del farmaco su un campione più ampio di animali, appartenenti sia a questa che ad altre specie di uccelli sensibili, verificando nel contempo se l'efficacia del trattamento possa essere influenzata da resistenze naturali al farmaco nelle popolazioni di plasmodi aviari così come sembra avvenire per i plasmodi responsabili della malaria umana.

BIBLIOGRAFIA

1. Valkiūnas G and TA Iezhova. (2018). Keys to the avian malaria parasites. *Malar. J.* 17: 212.
2. Valkiūnas G. (2005). *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, FL, US.
3. Fecchio A, Chagas CRF, Bell JA and K Kirchgatter. (2020). Evolutionary ecology, taxonomy, and systematics of avian malaria and related parasites. *Acta Trop.* 204: 105364.
4. MalAvi database <http://130.235.244.92/Malavi/index.html>
5. Martínez-de la Puente J, Santiago-Alarcon D, Palinauskas V and S Bensch. (2021). *Plasmodium relictum*. *Trends Parasitol.* 37: 355-356.
6. Valkiūnas G, Ilgūnas M, Bukauskaitė D, Fragner K, Weissenböck H, Atkinson CT and TA Iezhova. (2018). Characterization of *Plasmodium relictum*, a cosmopolitan agent of avian malaria. *Malar. J.* 17: 184.
7. Dimitrov D, Palinauskas V, Iezhova TA, Bernotienė R, Ilgūnas M, Bukauskaitė D, Zehtindjiev P, Ilieva M, Shapoval AP, Bolshakov CV, Markovets MY, Bensch S and G Valkiūnas. (2015). *Plasmodium* spp.: an experimental study on vertebrate host susceptibility to avian malaria. *Exp. Parasitol.* 148: 1-16.
8. McClure KM, Fleischer RC and Kilpatrick AM. (2020). The role of native and introduced birds in transmission of avian malaria in Hawaii. *Ecology.* 101: 03038.
9. Lapointe DA, Atkinson CT and MD Samuel. (2012). Ecology and conservation biology of avian malaria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1249: 211-26.
10. Grilo ML, Vanstreels RE, Wallace R, García-Párraga D, Braga ÊM, Chitty J, Catão-Dias JL and LM Madeira de Carvalho. (2016). Malaria in penguins - current perceptions. *Avian Pathol.* 45: 393-407.
11. Ross M, Avni-Magen N, Pe'er O, Berkowitz A and R Ofri. (2021). Treatment with chloroquine is retinotoxic in captive African penguins (*Spheniscus demersus*). Attenuation and recovery of electroretinographic responses. *Vet. Ophthalmol.* 24: 336-345.

12. Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ and DB Hutchinson DB. (1999). Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 533-541.
13. Suay-García B, Galán F, Rodríguez-Iglesias MA and MT Pérez-Gracia. (2019). Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in animals. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 19: 115-120.
14. Tang X, Zhao Z, Hu J, Wu B, Cai X, He Q and H Chen. (2009). Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 47: 951-958.
15. Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H and RT Pinheiro. (2000). Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. Biol. Sci.* 267: 1583-1589.
16. Hellgren O, Waldenström J and S Bensch. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J. Parasitol.* 90: 797-802.
17. Huang X and A Madan. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.
18. Koepfli C, Nguiragool W, Hofmann NE, Robinson LJ, Ome-Kaius M, Sattabongkot J, Felger I and I Mueller. (2016). Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Sci. Rep.* 6: 39183.
19. Lee SH, Kwak D and KT Kim. (2018). The first clinical cases of *Haemoproteus* infection in a snowy owl (*Bubo scandiacus*) and a goshawk (*Accipiter gentilis*) at a zoo in the Republic of Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 80: 1255-1258.
20. Palinauskas V, Valkiūnas G, Krizanauskiene A, Bensch S and CV Bolshakov. (2009). *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Further observation of effects on experimentally infected passeriform birds, with remarks on treatment with Malarone. *Exp. Parasitol.* 123: 134-139.
21. Ings K and D Denk. (2022). Avian malaria in penguins: Diagnostics and future direction in the context of climate change. *Animals.* 12: 600.
22. Staines HM, Burrow R, Teo BH, Chis Ster I, Kremsner PG and S Krishna. (2018). Clinical implications of *Plasmodium* resistance to atovaquone/proguanil: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 73: 581-595.

RINGRAZIAMENTI

La presente ricerca è stata realizzata con il contributo del Ministero della Salute nell'ambito del progetto RC IZSPB 01/2021.

STUDIO SULL'ANTIBIOTICO SENSIBILITA' DI BATTERI PATOGENI ISOLATI DA CANARINI E PAPPAGALLI

Leone S., Bottinelli M., Alessandri G., Fiorini P., Di Schiavi M., Vesentini G., Merenda M., Catania S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 Laboratorio di diagnostica clinica e sierologia di piano, via Bovolino, 1/C, 37060 Buttapietra (VR) Italia

Summary

Antimicrobial resistance is a threat to human and animal health. Measures aimed at its containment include reducing the use of antibiotics and choosing them conscientiously. Making use of laboratory techniques such as measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) enables the formulation of appropriate and effective therapy, consequently reducing the risk of developing antibiotic resistance. The aim of this study was to evaluate the antibiotic sensitivity of pathogenic bacteria isolated from canaries and parrots during 2017-2021. The results show that high percentages of strains of the bacterial species tested are sensitive to the tested antimicrobials, highlighting the lack of need to switch to alternative or critical antibiotics.

INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza è una delle problematiche di maggior impatto per la salute pubblica. L'utilizzo imprudente o errato di antibiotici porta alla selezione di popolazioni batteriche resistenti o multiresistenti, particolarmente difficili da debellare in caso di infezione. Difatti il Regolamento UE 429 del 2016 in tema di malattie animali trasmissibili fa esplicito riferimento all'antimicrobico resistenza come minaccia alla salute umana e animale sottolineando l'importanza di tutte le misure volte contenerla come, ad esempio, la riduzione dell'utilizzo di antibiotici. Nell'ottica One Health, l'uso dell'antibiotico, nel settore zootecnico ed anche in quello degli animali da compagnia, è **stato** gradualmente ridotto nel tempo a favore di un utilizzo più consapevole e basato su dati oggettivi ottenuti in laboratorio. A questo proposito, la possibilità di avvalersi di tecniche laboratoristiche come la misurazione della concentrazione minima inibente (MIC) consente ai liberi professionisti la formulazione di una terapia appropriata ed efficace, riducendo conseguentemente il rischio di sviluppo di antibiotico resistenza. Da diversi anni presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, l'analisi della MIC si è rivelata un valido strumento per valutare la sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici coinvolti negli eventi morbosi delle differenti specie animali. Considerato che gli uccelli ornamentali rappresentano la quarta categoria *pet* maggiormente diffusa in Italia dopo cani, gatti e pesci¹, abbiamo deciso di valutare l'antibiotico sensibilità di batteri patogeni isolati da canarini e pappagalli durante il periodo 2017-2021.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I ceppi batterici inclusi nello studio sono stati isolati dal marzo 2017 al febbraio 2021, durante la normale attività diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve).

Tali ceppi derivavano dai seguenti campioni:

- Tamponi cloacali o da altri distretti anatomici effettuati su canarini (*Serinus canaria*) e pappagalli (diverse specie appartenenti all'ordine degli Psittaciformi), conferiti presso l'IZSVe con richiesta di esame batteriologico.
- Uova o organi di canarini e di pappagalli sottoposti a necroscopia diagnostica presso l'IZSVe.

La determinazione della MIC è stata eseguita soltanto per le specie batteriche isolate aventi significato clinico/patologico, tenendo conto dell'anamnesi dei singoli soggetti e degli eventuali reperti anatomopatologici riscontrati.

I germi oggetto di studio sono risultati pertanto:

- *Escherichia coli* (*E.coli*);
- *Klebsiella* spp.;
- batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* diversi da *E.coli*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp.;
- *Staphylococcus* spp. Coagulasi negativi;
- *Staphylococcus* spp. Coagulasi positivi.

Il gruppo studio è risultato quindi composto da:

- 220 ceppi di *E.coli* di cui 143 isolati da canarino e 77 ceppi isolati da pappagallo;
- 34 ceppi di *Klebsiella* spp. isolati da canarino;
- 48 ceppi di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati da canarino;
- 119 ceppi di *Staphylococcus* spp. Coagulasi negativi di cui 67 isolati da canarino e 52 isolati da pappagallo;
- 35 ceppi di *Staphylococcus* spp. Coagulasi positivi isolati da canarino.

Isolamento e identificazione dei batteri

I tamponi sono stati seminati in maniera diretta su piastre di Blood Agar (Agar base, Biolife Italiana, Milano, Italia), sangue ovino (allevamento Blood, Castellalto, Italia), MacConkey's Agar (Biolife Italiana, Milano, Italia) e Bile-Esculine Agar (Biolife italiana, Milano, Italia). Le piastre sono state incubate a 37 ± 1 °C in condizioni di aerobiosi e di microaerofilia (atmosfera al 5% di CO₂). Ogni tampone è stato successivamente posto all'interno di una provetta contenente brodo di arricchimento (Heart Infusion Broth) (Biolife italiana, Milano, Italia).

In sede autoptica, aliquote degli organi di canarini e di pappagalli presentanti lesioni macroscopiche sono state campionate in maniera asettica e seminate come precedentemente descritto; allo stesso modo un'aliquota di tessuto è stata inoculata in una provetta contenente brodo di arricchimento.

Le piastre sono state controllate dopo 24 ore d'incubazione per verificare l'avvenuta crescita batterica. In caso di crescita, si è proceduto all'identificazione delle specie batteriche; in caso contrario le piastre di primo isolamento sono state reincubate per ulteriori 24 ore e 10 µl di brodo di arricchimento sono stati seminati seguendo le medesime procedure già descritte.

L'identificazione batterica è avvenuta attraverso la morfologia delle colonie in piastra, test ossidasi e catalasi, prove biochimiche in macrometodo e osservazione al microscopio ottico della morfologia cellulare previa colorazione di Gram.

Determinazione della MIC

La procedura di determinazione della MIC è stata eseguita con metodo di microdiluizione in brodo utilizzando micropiastre commerciali a 96 pozzetti preallestite con diverse concentra-

zioni di principi attivi in forma liofilizzata (Merlin Diagnostika, Bornheim, Germania). Le colonie batteriche in esame sono state prelevate da piastra Blood Agar e poste in brodo Mueller Hinton II (Cation-Adjusted) (Becton Dickinson Italia, Milano, Italia). All'interno dei pozzetti è stato inoculato brodo contenente tra 1 e 9×10^5 UFC/ml. Le piastre sono state incubate in aerobiosi a $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e la crescita batterica nei pozzetti è stata valutata dopo 16-20 ore di incubazione. Il valore di MIC di ciascun antimicrobico testato è stato corrispondente alla più bassa concentrazione di principio attivo per la quale non si è osservata crescita nel pozzetto. In particolare, sono stati valutati i valori di MIC per gli antibiotici in tabella 1 per i germi Gram-negativi allo studio e gli antibiotici in tabella 2 per quelli Gram-positivi. Sono stati valutati inoltre i valori MIC di antibiotici CIA (*Critically Important Antimicrobials*) presenti in tabella 3 per i Gram-negativi e tabella 4 per i Gram-positivi. Per l'espressione dei risultati si è fatto riferimento a *breakpoint* definiti per ognuno degli antibiotici in esame ed elencati nelle tabelle 1, 2, 3 e 4, espressi in $\mu\text{g/ml}$.

Antibiotico	Breakpoint per "sensibile"	Breakpoint per "resistente"	Fonte breakpoint
Aminosidina	8	32	SFM (per Kanamicina)
Ampicillina	8	32	CLSI-H
Florfenicolo	8	32	CLSI-V (per <i>S.cholerasuis</i>)
Tetraciclina	4	16	CLSI-H
Gentamicina	4	16	CLSI-H
Apramicina	16	32	BAKUM
Trimethoprim/ Sulfamethoxazolo	2	4	CLSI-H

Tabella 1: Antibiotici testati per batteri Gram-negativi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state la Società Francese di Microbiologia (SFM), il Clinical and Laboratory Standards Institute per microrganismi isolati nell'uomo (CLSI-H) o da animali (CLSI-V), il Laboratorio Diagnostico Veterinario di Bakum dell'Università di Hannover (BAKUM). Eventuali note sono presenti tra parentesi al lato della sigla.

Antibiotico	Breakpoint per "sensibile"	Breakpoint per "resistente"	Fonte breakpoint
Ampicillina	0,25	1	CLSI-V (altre specie)
Tiamulina	2	4	EUCAST (ECOFF per <i>Staph. aureus</i>)
Doxiciclina	4	16	CLSI-H M100 (2014)
Penicillina G	0,125	0,25	CLSI-V (derivato umana)
Lincomicina	2	8	SFM

Tabella 2: Antibiotici testati per batteri Gram-positivi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state il Clinical and Laboratory Standards Institute per microrganismi isolati nell'uomo presenti nel manuale M100 del 2014 (CLSI-H M100) e per microrganismi isolati da animali (CLSI-V), l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EU-

CAST) in riferimento a cut-off epidemiologici (ECOFF), la Società Francese di Microbiologia (SFM). Eventuali note sono presenti tra parentesi al lato della sigla.

Antibiotico	Breakpoint per “sensibile”	Breakpoint per “resistente”	Fonte breakpoint
Colistina	2	4	EUCAST, SFM
Enrofloxacin	0,25	2	CLSI-V
Flumequin	4	8	SFM

Tabella 3: Antibiotici CIA testati per batteri Gram-negativi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state l’European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), la Società Francese di Microbiologia (SFM), il Clinical and Laboratory Standards Institute per microrganismi isolati da animali (CLSI-V).

Antibiotico	Breakpoint per “sensibile”	Breakpoint per “resistente”	Fonte breakpoint
Tilmicosina	8	32	Y.WANG et al., 2008 ²
Tilosina	4	32	USDA

Tabella 4: Antibiotici CIA testati per batteri Gram-positivi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state l’articolo di Y.Wang et al. del 2008 “Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis” e l’U.S. Department of Agriculture (USDA).

La definizione di “sensibile” è stata attribuita ai ceppi batterici il cui valore di MIC, espresso in µg/ml, era inferiore o uguale al *breakpoint* di sensibilità definito per la combinazione batterio-antibiotico-specie animale.

RISULTATI

Nella tabella 5 è riportata la percentuale di ceppi batterici Gram-negativi allo studio risultata sensibile alle diverse molecole antibiotiche oggetto di studio, in base ai *breakpoint* definiti. In tabella 6 si trovano i medesimi dati relativi ai batteri Gram-positivi.

Antibiotico	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	Enterobatteriacee (non <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i>)
Aminosidina	92,73%	82,35%	95,83%
Ampicillina	62,27%	5,88%	37,50%
Florfenicolo	90,00%	61,76%	41,67%
Tetraciclina	75,00%	76,47%	81,25%
Gentamicina	95,91%	91,18%	93,75%
Apramicina	98,18%	94,12%	95,83%
Trimethoprim/ Sulfamethoxazolo	83,56%	82,35%	81,25%

Tabella 5: percentuale di ceppi batterici Gram-negativi sensibili per antibiotico in base ai breakpoint definiti.

Antibiotico	<i>Staphylococcus spp.</i> Coagulasi-negativo	<i>Staphylococcus spp.</i> Coagulasi-positivo
Ampicillina	76,47%	79,41%
Tiamulina	59,32%	94,29%
Doxiciclina	77,12%	65,71%
Penicillina G	67,23%	77,14%
Lincomicina	44,07%	14,29%

Tabella 6: percentuale di ceppi batterici Gram-positivi sensibili per antibiotico in base ai breakpoint definiti.

Per quanto riguarda i CIA, per i germi Gram-negativi sono stati testati gli antibiotici colistina, enrofloxacin e flumequina.

Tali sostanze, nella categorizzazione degli antibiotici destinati all'impiego negli animali stilata dall'EMA (*European Medicines Agency*)³, sono all'interno della categoria B ossia quella degli antibiotici da limitare in quanto importanti in medicina umana. Questi antibiotici dovrebbero essere utilizzati solo quando non ci sono antibiotici efficaci di altre categorie e dopo aver eseguito test di sensibilità. I risultati ottenuti sono visibili in tabella 7.

Antibiotico	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	Enterobatteriacee (non <i>E.coli</i>, <i>Klebsiella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i>)
Colistina	95,45%	82,35%	83,33%
Enrofloxacin	85,00%	76,47%	83,33%
Flumequina	86,36%	76,47%	83,33%

Tabella 7: percentuale di ceppi batterici Gram-negativi sensibili per antibiotico CIA in base ai breakpoint definiti.

Per i batteri Gram-positivi in studio, i CIA testati sono la tilosina e la tilmicosina.

Queste sostanze sono inserite nella categoria C della classificazione stilata dall'EMA e sono quindi antibiotici da utilizzare con attenzione, in quanto sono presenti delle alternative in medicina umana. Vengono utilizzati quando non ci sono antibiotici della categoria D disponibili o clinicamente efficaci. Gli antibiotici di categoria D sono antibiotici che devono essere utilizzati con prudenza e devono essere il trattamento di prima linea. I risultati ottenuti si trovano in tabella 8.

Antibiotico	<i>Staphylococcus spp.</i> coagulasi-negativo	<i>Staphylococcus spp.</i> coagulasi-positivo
Tilmicosina	75,42%	17,14%
Tilosina	72,03%	14,29%

Tabella 8: percentuale di ceppi batterici Gram-positivi sensibili per antibiotico CIA in base ai breakpoint definiti.

DISCUSSIONE

Canarini e pappagalli posseggono un microbiota intestinale principalmente costituito da batteri Gram-positivi⁴. Stress, alimentazione inadeguata, utilizzo di antimicrobici, patologie concomitanti, possono provocare uno squilibrio tra le popolazioni batteriche normalmente presenti a livello intestinale con una conseguente sovracrescita di batteri Gram-negativi^{5,6}. Alcune tra le specie più comunemente riscontrate in questi casi sono *E.coli*, *Klebsiella* spp. ed *Enterobacter* spp.⁷. Questi germi possono essere responsabili di enteriti, ma possono invadere anche altri distretti anatomici provocando sintomatologia respiratoria e/o nervosa o setticemia^{6,8}.

Per i batteri Gram-positivi, la specie in esame è stata *Staphylococcus* spp., un batterio commensale, oltre che ubiquitario nell'ambiente. Questo viene riscontrato spesso in caso di infertilità delle uova⁹, di artrite e/o sinovite e di dermatite⁸.

Inoltre, durante il periodo delle cove, *Staphylococcus* spp., *E.coli*, *Klebsiella* spp. e i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* vengono comunemente rilevati in corso di fenomeni morbosi caratterizzati da mortalità embrionale, neonatale o dei pullus e possono contribuire a provocare importanti perdite numeriche nell'allevamento dei *pet birds*⁹.

L'allevamento degli uccelli da compagnia in Italia è stato, in passato, piuttosto distante dalla medicina veterinaria; basti pensare che solo 20 anni fa i medici veterinari che nel territorio nazionale si occupavano della gestione sanitaria di tale tipologia di allevamento erano, al massimo, una decina. Ciò, nella scelta degli interventi terapeutici, ha eventualmente potuto favorire l'utilizzo del c.d. "fai date te" oppure del passaparola tra allevatori e rivenditori di uccelli, talvolta anche per quanto riguardava l'utilizzo dell'antibiotico.

Si può ipotizzare che la gestione sanitaria di questo tipo di allevamenti sia migliorata grazie alla maggior presenza di professionisti specializzati nel settore, alla formazione effettuata sul campo ed alla maggiore fruibilità di metodi diagnostici di laboratorio anche per tali tipologie di animali. Infine, da non dimenticare la maggiore consapevolezza ed attenzione alle problematiche sanitarie delle nuove generazioni di allevatori che quindi correttamente si affidano a professionisti per la gestione sanitaria dei gruppi.

I risultati del nostro studio mettono in evidenza che alte percentuali di ceppi delle specie batteriche testate sono sensibili ad antimicrobici non-CIA, sottolineando che nel settore dei *pet birds* esistono ancora ottimi margini di manovra terapeutici, anche di primo intervento, e la mancata necessità di passare ad antibiotici alternativi o critici.

Rimane comunque da evidenziare che gli stafilococchi Coagulasi-positivi sono risultati la specie batterica meno sensibile tra quelle testate, con basse percentuali di ceppi batterici sensibili agli antibiotici CIA allo studio. Tale dato risulta particolarmente importante, oltre che dal punto di vista terapeutico, anche dal punto di vista della salute umana, in quanto gli uccelli da compagnia possono trasmettere batteri ai loro detentori o diffonderli nell'ambiente rappresentando un potenziale pericolo zoonotico¹⁰.

CONCLUSIONI

L'utilizzo prudente e coscienzioso degli antimicrobici, basato su dati oggettivi come i test di antimicrobico-sensibilità, risulta attualmente la nostra principale arma nei confronti dell'antibiotico resistenza. I dati ottenuti devono essere considerati uno stimolo al continuo miglioramento dell'approccio terapeutico in corso di eventi morbosi e sottolineano l'importanza del controllo sanitario attraverso la diagnosi laboratoristica e il dato della MIC. La raccolta e la divulgazione di questi dati (come avviene ad esempio per l'IZSVE attraverso la sua pagina web <https://www.izsvenezie.it/antibiotico-sensibilita-report-mic/>) può essere di ausilio

al Medico Veterinario nelle scelte di primo intervento, oltre a supportarlo nella formazione degli altri professionisti del settore sul tema dell'antibiotico sensibilità e sui risvolti ben più importanti dell'antibiotico resistenza. Ulteriori studi saranno necessari per comprendere la diffusione di batteri antibiotico resistenti nei volatili *pet* e per approfondirne le caratteristiche anche da un punto di vista genetico.

BIBLIOGRAFIA

1. Eurispes. *Rapporto Italia 2022*. <https://eurispes.eu/ricerca-rapporto/rapporto-italia-2022/>. Consultato il 31 luglio 2022.
2. Wang, Y., Wu, C. M., Lu, L. M., Ren, G. W., Cao, X. Y., Shen, J. Z. (2008). Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary microbiology*, 130(1-2), 118–125.
3. The European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health/>. Consultato il 31 luglio 2022.
4. Xenoulis, P. G., Gray, P. L., Brightsmith, D., Palculict, B., Hoppes, S., Steiner, J. M., Tizard, I., Suchodolski, J. S. (2010). Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Veterinary microbiology*, 146(3-4), 320–325.
5. Jones, D. M., and Nisbet, D. J. (1980). The gram negative bacterial flora of the avian gut. *Avian Pathology*, 9:1, 33-38.
6. Doneley R. J. (2009). Bacterial and parasitic diseases of parrots. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 12(3).
7. Davies, Y. M.; Franco, L. S.; Barbosa, F. B.; Vanin, C. L.; Gomes, V. T. M.; Moreno, L. Z.; Barbosa, M. R. F.; Sato, M. I. Z.; Moreno, A. M.; Knöbl, T. (2022). Use of MALDI-TOF for identification and surveillance of gram-negative bacteria in captive wild psittacines. *Brazilian Journal of Biology*, 82, 233523.
8. Fudge, A. M. (2001). Diagnosis and treatment of avian bacterial disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(1), 3–11.
9. Catania S., Bilato D., Capitanio M., Barina M., Sturaro A., Iob L. (2009). Il controllo precova: come strumento per il miglioramento dei risultati riproduttivi nell'allevamento del canarino. *62° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini*. Pag. 9.
10. Ahmed, H. A., Awad, N., Abd El-Hamid, M. I., Shaker, A., Mohamed, R. E., Elsohaby, I. (2021). Pet birds as potential reservoirs of virulent and antibiotic resistant zoonotic bacteria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 75, 101606.



INDICE DEGLI AUTORI

A

Aisa F. 225
Alessandri G. 253

B

Bacchin C. 157
Bano L. 133, 139, 157, 163
Benedetti V. 213
Bertolotti L. 185
Bertuzzi S. 81
Bonfante F. 133, 139
Borrelli L. 107
Borsato E. 219
Bottinelli M. 91, 253
Bottin S. 157
Bove A. 235
Bozzo G. 175
Brescia M. 225
Bruno F. 91
Budai J. 91

C

Cafiero M. 245
Camarda A. 125, 163, 169, 175, 235, 245
Casagrande Proietti P. 225
Casalino G. 235
Castellina C. 185
Catania A.M. 185
Catania S. 91, 147, 253
Catelli E. 213
Cecchinato M. 191, 203, 219
Ceci E. 175

Circella E. 125, 169, 175, 235, 245
Cordioli B. 157, 163
Coretti L. 107
Cornaggia M. 163
Costantino I. 225
Crescenzo G. 175
Cristovao Borges L. 147

D

D'Amico F. 235
Dauphin G. 203
De Cesare A. 81
De Nardi R. 91
Di Castri A. 163
Di Francesco C.E. 117
Dimuccio M.M. 175, 235
Dinardo F.R. 235
Dipineto L. 107
Di Schiavi M. 253
D'Onghia F. 235
Drigo I. 133, 139, 157, 163
Drigo M. 219
Drus J-E. 99

F

Felici M. 69
Ferri G. 117
Festino A.R. 117
Fioretti A. 107
Fiorini P. 253
Franciosini M.P. 225
Franzo G. 191, 203

G

Gaimard M. 99
Gastaldelli M. 147
Gavazzi L. 107
Ghiselli F. 69
Giorato M. 219
Giovagnoni G. 69
Gobbi M. 225
Gobbo F. 91, 133, 139
Greggio E. 219
Grego E. 185
Grilli E. 63, 69
Guolo A. 139, 157

H

Homonnay Z. 203

I

Indio V. 81

K

Koutoulis K.C. 191, 203

L

Lefebvre C. 99
Legnardi M. 191, 203
Lembo F. 107
Leone S. 253
Lesceu S. 99
Lombardi R. 6, 235, 245

Lucchi A. 81
Lupini C. 213

M

Manfreda G. 81
Marsilio F. 117
Matucci A. 147
Merenda M. 253
Mescolini G. 213
Montagner A. 157
Morandin M. 219
Musa L. 225

N

Napoletano V. 6, 235

P

Pace A. 107
Palazzolo L. 157, 163
Parra Titos E. 81
Pasquali F. 81
Patregnani T. 91
Piva A. 63, 69
Pourquier P. 99
Prandini F. 213
Pugliese N. 125, 169, 175, 245

Q

Quaglia G. 213

R

Raele D. 245
Redal C. 99

Righetti V. 147

Rizzardi A. 139, 157, 163

Romito D. 169

Ruffini F. 117

Russo T.P. 107

S

Salata C. 219

Saleh M. 125, 169, 175, 245

Samarelli R. 125, 169, 175, 245

Santaniello A. 107

Schiavone A. 125, 169, 175, 245

Siddique I. 125, 169, 175, 245

Silvestrin L. 219

Simi G. 219

Smoglica C. 117

Stefanetti V. 225

Stefani E. 147

Stella M.C. 185

Streparola G. 163

T

Terregino C. 21, 91, 139

Tondo A. 147

Tonellato F.R. 191

Tonon E. 139

Toppi V. 225

Tovani A. 213

Tucciarone C.M. 191, 203, 219

Tugnoli B. 63, 69

V

Varriale L. 107

Vascellari M. 133

Vergara A. 117

Vesentini G. 253

Vianello L. 219

Vianello S. 147

Viel L. 163

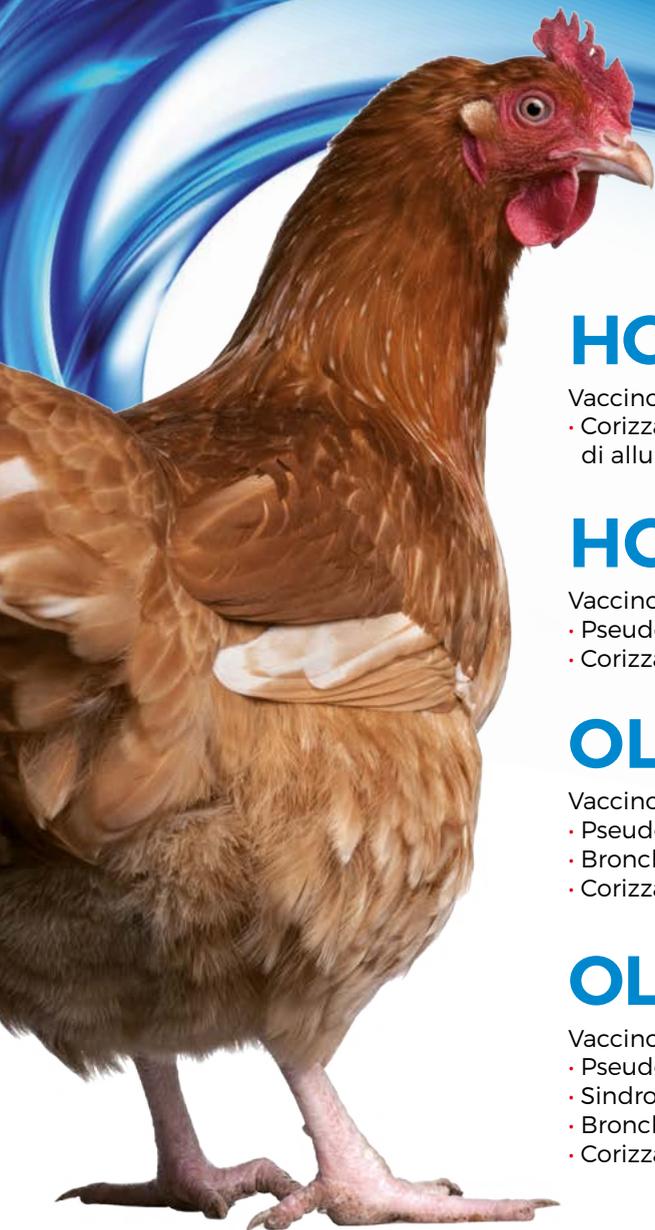
Z

Zanardello C. 91, 133

Zandonà L. 133, 139

Zarpellon G. 157, 163

La gamma più ampia e completa di vaccini per la prevenzione della CORIZZA INFETTIVA AVIARE



HG-GEL-VAC

Vaccino inattivato contro:

- Corizza infettiva aviare adsorbito all'idrossido di alluminio

HG-OLVAC®

Vaccino inattivato contro:

- Pseudopeste aviare
- Corizza infettiva aviare

OLVAC® B+HG

Vaccino inattivato contro:

- Pseudopeste aviare
- Bronchite infettiva
- Corizza infettiva aviare

OLVAC® A+B+HG

Vaccino inattivato contro:

- Pseudopeste aviare
- Sindrome calo di deposizione (EDS '76)
- Bronchite infettiva
- Corizza infettiva aviare



La salute animale per la salute dell'uomo

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



IL 100% DELLA
VACCINAZIONE
COCCIDIOSI
È POSSIBILE

EVANT®

con **HIPRAMUNE® T**
Sospensione e solvente per spray orale per polli

Vaccino vivo attenuato contro la coccidiosi
nei polli in sospensione per spray orale

Powered by

**HIPRA
SMART
VACCINATION®**

EVANT® sospensione e solvente per spray orale per polli. **COMPOSIZIONE:** ogni dose (0,007 ml) di vaccino non diluito contiene: *Eimeria acervulina* ceppo 003, 332-450*; *Eimeria maxima* ceppo 013, 196-265*; *Eimeria mitis* ceppo 006, 293-397*; *Eimeria praecox* strain 007, 293-397*; *Eimeria tenella* ceppo 004, 276-374*. *Numero di oocisti sporulate. **SOLVENTE:** HIPRAMUNE®T. **INDICAZIONI:** per l'immunizzazione attiva dei pulcini a partire da 1 giorno di età per ridurre le lesioni intestinali e la produzione di oocisti associate a coccidiosi provocata da *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* ed *Eimeria tenella* e per ridurre segni clinici (diarrea) associati a *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella*. Inizio dell'immunità: 14 giorni dopo la vaccinazione. **POSOLOGIA E VIA DI SOMMINISTRAZIONE:** per uso orale. Il metodo di somministrazione è mediante spray a gocce grosse servendosi di un dispositivo adatto. Prima di iniziare la preparazione, verificare di avere a disposizione un contenitore pulito con capacità sufficiente alla preparazione della sospensione di vaccino diluito: capacità da 280 ml, 1.400 ml o 2.800 ml rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi. Aggiungere dell'acqua a temperatura ambiente (223 ml, 1.115 ml o 2.230 ml di acqua rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi). Agitare il flacone del solvente. Diluire il contenuto del flacone con acqua pulita a temperatura ambiente in un contenitore adeguato. Agitare il flacone del vaccino e diluire il contenuto nella soluzione preparata. Dopo la diluizione si ottiene una sospensione violacea. Riempire il serbatoio del dispositivo nebulizzatore con la sospensione di vaccino preparata. Durante la somministrazione ai pulcini mediante spray a gocce grosse, mantenere la sospensione di vaccino diluito costantemente omogeneizzata, usando un agitatore magnetico. Per migliorare l'uniformità della vaccinazione, è consigliabile tenere i pulcini all'interno del box di trasporto per almeno 1 ora, in modo che possano assimilare tutte le gocce di vaccino. Dopo questo periodo di tempo, posare i pulcini delicatamente sulla lettiera e proseguire con le regolari pratiche di gestione. **POSOLOGIA:** una dose di vaccino (0,007 ml) a partire da 1 giorno di età. **REAZIONI AVVERSE:** nessuna. **TEMPO DI ATTESA:** 0 giorni. **PRECAUZIONI SPECIALI:** i polli nelle prime 3 settimane dopo la vaccinazione devono essere assolutamente allevati a terra. Si raccomanda di eliminare la lettiera e di pulire le strutture e i materiali fra i cicli di produzione per ridurre le infezioni di campo. Non deve essere utilizzata nessuna sostanza anticoccidica o altri agenti con attività anticoccidica attraverso l'alimentazione o l'acqua per almeno 3 settimane dopo la vaccinazione dei polli con questo prodotto, in caso contrario la replicazione corretta delle oocisti del vaccino, e di conseguenza lo sviluppo di un'immunità solida potrebbero essere compromesse. Inoltre, la durata dell'immunità dipende dall'ambiente che permette il riciclo delle oocisti, quindi deve essere tenuto presente che una decisione di utilizzare sostanze anticoccidiche nel periodo di 3 settimane dopo la vaccinazione debba essere presa tenendo in considerazione il potenziale impatto negativo sulla durata dell'immunità di questo prodotto. Conservare e trasportare il vaccino in frigorifero (2 °C-8 °C). Non congelare. Periodo di validità del medicinale veterinario confezionato per la vendita: 10 mesi. Periodo di validità dopo diluizione conformemente alle istruzioni: 10 ore. **CONFEZIONI:** scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® contenente 7 ml (1.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE®T contenente 50 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® contenente 35 ml (5.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE®T contenente 250 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® contenente 70 ml (10.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE®T contenente 500 ml. **NUMERO DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** EU/2/18/233/001-003. **TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** LABORATORIOS HIPRA, S.A. Avda. La Selva, 135, 17170 Amer (Girona), Spagna. Tel. (34) 972 430660- Fax (34) 972 430661. **RAPPRESENTANTE LOCALE:** Hipra Italia S.R.L., Via E. Mattei n. 2, 25030 Coccaglio (Brescia), ITALIA. Tel. (+39) 030 7241821, Fax (+39) 030 7700881. **CONDIZIONI PER LA DISTRIBUZIONE:** medicinale veterinario soggetto a prescrizione. **SOLO PER USO VETERINARIO. USARE I MEDICINALI RESPONSABILMENTE.**

LE UOVA POSSONO ESSERE
PIÙ ROBUSTE?



Con BACTOCELL,
riduci il numero degli **scarti!**

BACTOCELL è un batterio probiotico che ha costantemente dimostrato i suoi benefici nelle galline ovaiole.

Promuovendo l'integrità dell'intestino, BACTOCELL aiuta la formazione di gusci più robusti e riduce il numero degli scarti.

BACTOCELL
LACTIC ACID BACTERIA FOR MONOGASTRICS

Not all products are available in all markets nor associated claims allowed in all regions.

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com +39 327 4147 662 – Email: animalitaly@lallemand.com

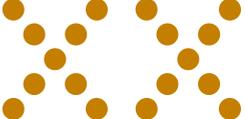
LALLEMAND

**BAD THINGS
COME IN**



Con l'ampio spettro d'azione su tre diversi sierogruppi di Salmonella, Salenvac ETC di MSD Animal Health è il tuo nuovo partner per la protezione dei tuoi animali.

Nobilis®
SALENVAC® ETC

va  inova[®]

veterinary prevention strategies



POULVAC[®]
E. coli

**PER I TUOI ANIMALI
PER LA SALUTE
PER TE**



zoetis

Finito di stampare
nel mese di Ottobre 2022
da Litografia La Ducale Srl - Parma

