



**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARIA**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria  
2024**



**LXIII CONVEGNO NAZIONALE SIPA  
IX SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**Rimini (RN), 10 Maggio 2024  
Lodi (LO), 12/13 Settembre 2024**

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2024**

**Rimini (RN), 10 Maggio 2024  
Lodi (LO), 12/13 Settembre 2024**

## INDICE

*Prefazione* ..... pag. 15

### ATTI DEL LXIII CONVEGNO NAZIONALE SIPA

*Rimini (RN), 10 Maggio 2024*

#### CONVEGNO

#### AVICONIGLICOLTURA ITALIANA: SOSTENIBILITÀ E TRASFERIBILITÀ NEL MONDO

- RAISING SLOW-GROWING BROILERS IN HOLLAND  
*Bosman S.* ..... pag. 18
- L'ALLEVAMENTO DEL POLLO DA CARNE A LENTA CRESCITA IN ITALIA  
*Scolari A.* ..... pag. 21

### ATTI DEL IX SIMPOSIO SCIENTIFICO

*Lodi, 12/13 Settembre 2024*

#### COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN ARRAY DI REAL-TIME RT-PCR PER LA RAPIDA PATOTIPIZZAZIONE DEL PARAMYXOVIRUS AVIARIO DI TIPO I (APMV-1)  
*Fortin A., Laconi A., Monne I., Cecchinato M., Crimauto M., Valastro V., D'Amico V., Bortolami A., Gastaldelli A., Varotto M., Terregino C., Panzarin V.* ..... pag. 31
- SORVEGLIANZA PER INFLUENZA AVIARE IN VOLATILI SELVATICI IN REGIONE LOMBARDIA NEL PERIODO 2022-2024  
*Trogu T., Bellini S., Canziani S., Carrera M., Chiapponi C., Chiari M., Farioli M., Fusaro A., Nucci A., Soliani L., Bortolami A., Terregino C., Lavazza A., Moreno A.* ..... pag. 38

- VIROSI AVIARIE IN AVIFAUNA DECEDUTA PRESSO UN CENTRO RECUPERO ANIMALI SELVATICI DELLA LOMBARDIA: RISULTATI DEL MONITORAGGIO NELL'ANNO 2023  
*Rapi M.C., Musa L., Santandrea F., Lelli D., Moreno A., Lavazza A., Raimondi S., Farioli M., Chiari M., Bianchi G.B.M., Grilli G. .... pag. 46*
- CARATTERIZZAZIONE DELL'INTERFACCIA UCCELLI DOMESTICI-FAUNA SELVATICA IN UN'AREA AD ELEVATO RISCHIO DI INTRODUZIONE DI INFLUENZA AVIARIA  
*Graziosi G., Lupini C., Dalla Favera F., Martini G., Dosa G., Trevisani G., Garavini G., Mannelli A., Catelli E. .... pag. 65*
- EVIDENZE SIEROLOGICHE DELLA CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV) IN BROILER IN ITALIA  
*Tucciarone C.M., Legnardi M., Cecchinato M., Franzo G., Poletto F., Miccio L., Busquet M., Carceller E., Dardi M., Solé M., Pasotto D. .... pag. 70*
- REOVIRUS AVIARI ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI BROILER DEL NORD-EST ITALIA NEL 2019-2024, CARATTERISTICHE GENETICHE E CASI CLINICI  
*Bortolami A., Viel L., Zandonà L., Leardini S., Castaldello I., Franzo G., Gavazzi L., Luisetto P., Pastori A., Fusaro A., Cecchinato M., Rinaldi E., Catania S., Terregino C. .... pag. 77*
- IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI RIASSORTANTI DELL'EUROPA NORDOCCIDENTALE (GENOTIPO A3B1) IN ITALIA  
*Poletto F., Tonellato F.R., Tucciarone C.M., Franzo G., Broggi M., Pirota M., Falappa S., Ceroni S., Cecchinato M., Legnardi M. .... pag. 83*
- VACCINAZIONE PER LA BURSITE INFETTIVA AVIARE NEL POLLO DA CARNE: APPLICABILITÀ DEI VACCINI VIVI ATTENUATI AL PRIMO GIORNO DI VITA PER VIA SOTTOCUTANEA  
*Lupini C., Pedrazzoli S., Lizzi G., Quaglia G., Graziosi G., Salaroli R., Russo E., Gentile N., Longoni C., Anfossi P., Catelli E. .... pag. 90*
- IMPATTO DELLA DIFFUSIONE GLOBALE, DELL'EPIDEMIOLOGIA E DELLE STRATEGIE DI CONTROLLO SULL'EVOLUZIONE DEL LINEAGE GI-19 (Genotipo QX) DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA  
*Franzo G., Faustini G., Tucciarone C. M., Poletto F., Tonellato F. R., Cecchinato M., Legnardi M. .... pag. 96*

- PRIMA IDENTIFICAZIONE DI CEPPI IB80-LIKE (GENOTIPO GVIII) DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA  
*Legnardi M., Poletto F., Andolfatto C., Franzo G., Bianco L., Cecchinato M., Tucciarone C.M.*..... **pag. 112**
- ANALISI MOLECOLARI IN CORSO D'INFEZIONE DA ADENOVIRUS IN PSITTACIDI EVIDENZIANO LA CIRCOLAZIONE DI NUOVI TIPI VIRALI E AMPIA VARIABILITÀ GENETICA  
*Lizzi G., Fasana S., Grilli G., Quaglia G., Pedrazzoli S., Graziosi G., Catelli E., Musa L., Rapi M.C., Lupini C.*..... **pag. 118**
- NUOVI SISTEMI ANALITICI PER COMPRENDERE IL COMPLESSO EQUILIBRIO AVICOLO. UN CASO CLINICO PER CONDIVIDERE LE POTENZIALITÀ DEL SISTEMA  
*Tata A., Zacometti C., Massaro A., Leone A., Falappa S., Ceroni S., Catania S.* ..... **pag. 124**
- IMPIEGO DELLA FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY PER LA TIPIZZAZIONE DI RIEMERELLA ANATIPESTIFER  
*Zandonà L., Drigo I., Cordovana M., Cordioli B., Guolo A., Garbuio M., Rizzardi A., Vedana M., Girotto E., Bano L.*..... **pag. 140**
- RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELL'ENTERITE NECROTICA DEL TACCHINO IMPIEGANDO DIVERSI CEPPI DI CLOSTRIDIUM PERFRINGENS  
*Cordioli B., Drigo I., Palazzolo L., Garbuio M., Zandonà L., Zanardello C., Gagliazzo L., Guolo A., Bano L., Vereecken M.* ..... **pag. 146**
- COMBINAZIONE DI VACCINI SALMONELLA VIVI E INATTIVATI PER IL CONTROLLO DELLA TIFOSI AVIARE IN GALLINE OVAIOLE  
*Joaquim P., Balbiani F., Socas L., Morales H., Rubio J., Gomez M., Chacana P.* .... **pag. 158**
- MUCISPIRILLUM SCHAEGLERI COME POSSIBILE BIOMARKER DELLA SALUTE INTESTINALE DEI POLLI  
*Borrelli L., Coretti L., Turco L., Santaniello A., Lembo F., Fioretti A., Dipineto L.* .. **pag. 165**
- VALUTAZIONE IN VITRO DELL'EFFICACIA ANTIMICROBICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI CANNELLA NEI CONFRONTI DI STIPI TI APEC (AVIAN PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI)  
*Casalino G., Camarda A., Bozzo G., Dinardo F.R., Bove A., Romito D., Dimuccio M.M., Circella E.* ..... **pag. 172**

- ATTIVITA ANTICOCCIDICA IN VITRO E IN VIVO DI PRINCIPI ATTIVI VEGETALI NEI CONFRONTI DI EIMERIA SPP.  
*Carlu C., Chabrilat T., Del Zozzo F., Girard C., Kerros S. .... pag. 181*
  
- UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI COMPOSTI BOTANICI MIGLIORA LE PERFORMANCE PRODUTTIVE E LA SALUTE INTESTINALE DI POLLI DA CARNE VACCINATI PER COCCIDIOSI  
*Giovagnoni G., Tugnoli B., Piva A., Khattak F., Grilli E. .... pag. 189*
  
- STUDIO PRELIMINARE SUL RUOLO DEGLI UCCELLI SELVATICI COME BIOINDICATORI DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA AMBIENTALE  
*Esposito E., Scarpellini R., Celli G., Marliani G., Zaghini A., Mondo E., Piva S. .... pag. 194*
  
- PRELIMINARY INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE IN POULTRY AND SYNANTHROPIC BIRDS OF AN URBAN SYSTEM OF SOCIAL AGRICULTURE IN NAPLE  
*Santaniello A., Russo T.P., Dipineto L., Borrelli L., Mastronardi D., Fioretti A. .. pag. 200*
  
- IMPLICAZIONI DI SICUREZZA ALIMENTARE IN EPISODI DI BOTULISMO IN GALLINE OVAIOLE  
*Cordioli B., Zandonà L., Harper V., Garbuio M., Drigo I., Guolo A., Genovese S., Ferro T., Capello K., Viel L., Bano L. .... pag. 208*
  
- PREVALENCE OF CAMPYLOBACTER SPP. THROUGH THE POULTRY MEAT PRODUCTION CHAIN IN THREE ITALIAN REGIONS  
*Tirioni E., Roila R., Scarano C., Branciarri R., Meloni M.P., Piras F., Siddi G., De Santis E.P.L., Bernardi C., Addis M.F., Locatelli C., Penati M., Garofolo G., Marotta F., Urgesi P., Fusi V., Gaviglio A., De Martini E., Stella S. .... pag. 213*
  
- **INDICE DEGLI AUTORI** ..... **pag. 222**

# ROSS 308 DELIVERS

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

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



Aviagen®





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

INNOVAZIONE

PROTEZIONE

VALORE  
AGGIUNTO



# Combatti la salmonella con Primun

Primun Salmonella *E* / Primun Salmonella *T*

- Durata dell'immunità\*
- Protezione\*\*
- Precisione nella diagnostica

Primun Salmonella *E*



Prospetto

Primun Salmonella *T*



Prospetto

**CALIER**

\* Secondo SPC / \*\* Impiego in deposizione nei paesi autorizzati

## Primun Salmonella *E*

- Vaccino vivo contro Salmonella *Enteritidis*
- Unico autorizzato nel periodo di produzione\*\*
- Protezione estesa di 40 settimane dopo l'impiego in deposizione

## Primun Salmonella *T*

- Vaccino vivo contro Salmonella *Typhimurium*
- Autorizzato per avicoli a ciclo lungo e polli da ingrasso
- Diagnostica per il differenziamento del ceppo vaccinale mediante PCR



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



# AviPro™

## Salmonella DUO

Primo e unico vaccino vivo **bi**valente contro la Salmonella.



- Protezione omologa contro *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (ST) <sup>1-4</sup>.
- Sviluppo ottimale dell'immunità nei confronti di entrambi i sierotipi di Salmonella (metodo di co-fermentazione) <sup>5, 6</sup>.
- Escrezione limitata e sopravvivenza ridotta nell'ambiente dei ceppi vaccinali <sup>7</sup>.
- Riduzione del rischio di contaminazione delle uova <sup>8</sup>.
- Somministrazione orale in acqua da bere:
  - alternativa semplice ed economica alla somministrazione parenterale;
  - meno stress per gli animali.
- Protezione precoce e di lunga durata <sup>9-12</sup>:
  - produzione di IgA secretorie (IgAs);
  - sviluppo di immunità cellulo-mediata.

**AviPro Salmonella Duo:** *S. Enteritidis*, ceppo Sm24/Rif12/Ssq. 1-6 x 108 CFU; *S. Typhimurium*, ceppo ceppo Na1 2/Rif 9/Rtt. 1-6 x 108 CFU. Il foglio illustrativo di AviPro Salmonella Duo è consultabile presso il Prontuario AISA online: [prontuarioveterinario.it](https://www.prontuarioveterinario.it) (<https://www.prontuarioveterinario.it/>)

### Bibliografia

1 Methner U. (2007). 2 Hassan JO, et al. (1994). 3 Hassan JO, et al. (1996). 4 Desloges N, Et al. (2010). 5 Schroder et al. (2011). 6 Schroder et al (2010). 7 Linde et al, 1997. 8 Gantois I, Ducatelle R, et al. ( 2006). 9 Kaspers (2001). 10 Shahin A. , (2005) 11. Barrow (2007) 12. Barrow and Methner, (2013)

**AviPro™**  
Salmonella DUO

Salmonella **360°**  
Solutions

**FSP**  
Food Safety Program

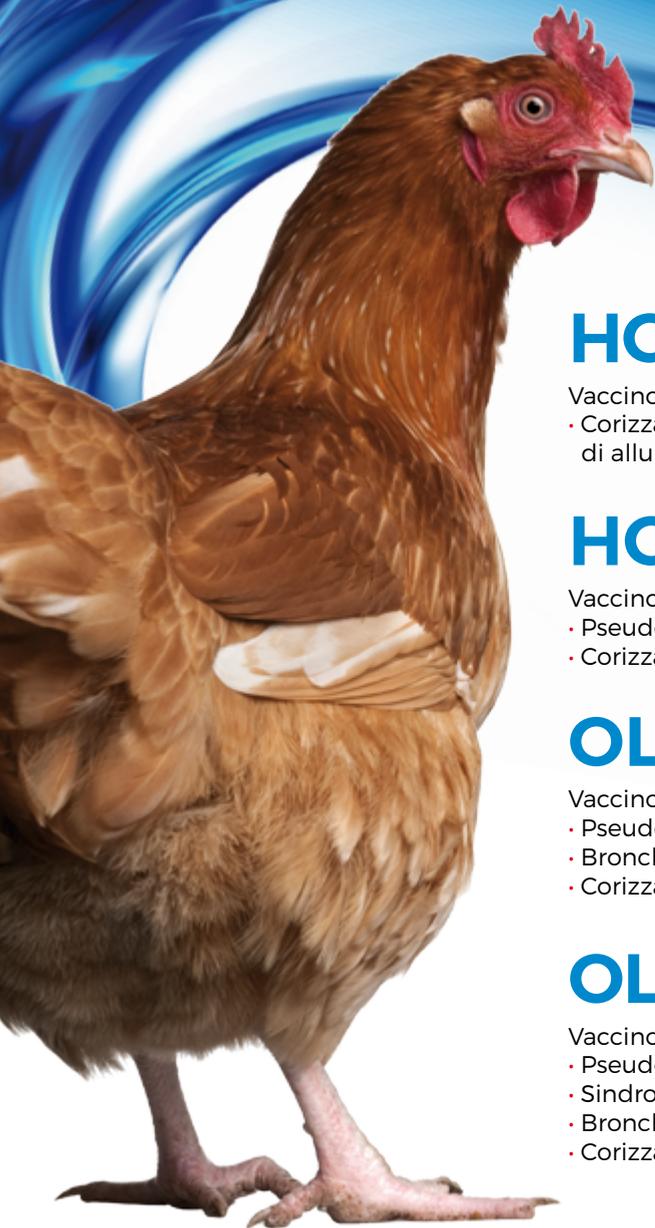
**Elanco™**

AviPro, Elanco e la barra diagonale sono marchi registrati di Elanco o sue affiliate.

Materiale riservato ai Medici Veterinari e agli Allevatori Professionisti.

Consultare il proprio Medico Veterinario per le indicazioni sulla prescrizione e l'uso corretto del prodotto.

# 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](http://www.fatro.it) - [info@fatro.it](mailto:info@fatro.it)



Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2024  
sono realizzate grazie al contributo di:



LALLEMAND ANIMAL NUTRITION



## PREFAZIONE

Legnaro (PD), 19 giugno 2024

Prima di riassumere e commentare le attività svolte e da svolgere nel 2024, ritengo opportuno ricordare il successo ottenuto dalla nostra società scientifica nell'organizzazione del XXII Congresso della *World Veterinary Poultry Association* (WVPA), che ha visto circa 2000 esperte ed esperti provenienti dal mondo produttivo, istituzionale ed accademico, confrontarsi e condividere conoscenze e prospettive future del settore avicolo, grazie a un programma che ha visto oltre 160 interventi scientifici. Voglio condividere con voi i numerosi apprezzamenti ricevuti da parte dei partecipanti al convegno, degli sponsor e del board della WVPA. In particolare desidero riportarvi in lingua originale un tratto della lettera ricevuta dal prof. Sjaak De Wit, presidente della WVPA: "Your hard work to combine science, business interactions, incredible social entertainment and the rich and inspiring Italian culture was very much appreciated by the many participants from different backgrounds and countries. WVPAC2023 was crowned by a big success which will remain with all attendees as life-lasting memories". Tutto questo non sarebbe stato possibile senza il contributo di tanti di noi che, a vario titolo, hanno reso possibile un evento di tale portata. Grazie di cuore!!!

Il Convegno annuale della nostra Società si è svolto, in collaborazione con l'Associazione Scientifica di avicoltura (sezione Italiana della WPSA), e con l'Associazione Scientifica di Avicoltura (ASIC), a Rimini il 10 maggio 2024, ed ha avuto come titolo "Aviconiglicoltura italiana: sostenibilità e trasferibilità nel mondo".

Gli interventi del Dott. Buttazoni (Referente FAO del *National Focal Point italiano*) e del Prof. Cassandro (Università degli Studi di Padova) sono stati incentrati sulle risorse genetiche avicunicole e sul loro utilizzo in sistemi di allevamento alternativi. Le relazioni del Dott. Scolari (Laboratorio Vallerana Srl) e della Dott.ssa Bosman (Poultry Vets, The Netherlands) hanno messo in evidenza le diverse caratteristiche dell'allevamento del pollo a lenta crescita nel nostro Paese e in Olanda.

Dopo tanti anni di assenza dalle sedi universitarie, il IX Simposio Scientifico si terrà a Lodi presso la sede del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali dell'Università degli studi di Milano. Qui verranno presentati dai nostri soci numerosi lavori scientifici e ci sarà un intervento del Prof. Daniele Gallazzi, già presidente della nostra società, dal titolo "Congressi scientifici: difficile farsi capire?". Un ringraziamento particolare va al Prof. Guido Grillo che giocando in casa ci ha aiutato nell'organizzazione di questo evento.

Mi preme infine spendere queste ultime righe nel ricordo del Dott. Corrado Longoni, improvvisamente scomparso all'inizio di quest'anno. La sua grande professionalità, la passione e l'entusiasmo sempre profusi come operatore a vario titolo nel settore avicolo, rimarranno nella storia della nostra società.

*Prof. Mattia Cecchinato*  
*Presidente SIPA*





ATTI DEL LXI CONVEGNO NAZIONALE SIPA

## **CONVEGNO**

**Aviconiglicoltura italiana:  
sostenibilità e trasferibilità nel mondo**

Rimini (RN), 10 Maggio 2024

# **RAISING SLOW-GROWING BROILERS IN HOLLAND AND ITALY: DIFFERENCES AND SIMILARITIES. THE DUTCH POINT OF VIEW.**

Drs Bosman S.

*Veterinarian and Owner of Poultry Vets*

## **Introduction**

Poultry Vets a Dutch private practice consisting of three locations spread across the Netherlands and one location in Germany. Thirteen veterinarians, 7 supportive staff. Specialists practice in poultry health.

*The Dutch market in transition:*

The transition in the Dutch Broiler market towards almost all of the market consisting of slow growing broilers is due to “Exploding Chicken campaign” launched by a Dutch NGO.

Now due to this transition the broiler meat production in the Netherlands decreased 40% (410 million broilers 2015 -> 312 million in 2022). In 2023 the Dutch broiler production consisted for 50% of “1 star Better Life Quality label”. Critical in this enormous transition was the decision of almost all Dutch retailers to ban conventional broiler meat.

Until 2022 the soled label in the retail was ‘Chicken of Tomorrow’ slow growing breed. The terms of this brand were relatively easy to meet for the producers: 16 animals per m<sup>2</sup> or 12 animals per m<sup>2</sup> of a slow growing breed. A 49 days life cycle, with a maximum Daily weight gain of 50gr or 45gr. The selling price of this label was approximately: 8 Euro per kg file.

In 2023 almost all retailers upgraded their welfare brand and decided to change into the ‘1 star better life quality label’ with even more strict and additional conditions. 12 animals per m<sup>2</sup> including 30% extra outdoor space as a winter garden, daylight windows, obligated grain spreading every day 2 grams per animal and obligated straw bales as distraction material. Especially the obligated winter garden is an expensive and almost impossible obligation due to legislation in the Netherlands.

*Sanitary Issues Slow Growing Broilers.*

One of the management problems is the restricted daily weight gain due to the maximum target of 25kg per m<sup>2</sup>, which is a very strict target. Unfortunately the breed that is used; Hubbard 757 or Ross ranger gold have more growth potential, especially in the cold winter time. This leads to more pecking and restlessness behaviour. Another management problem is ventilation pattern disturbances due to the non-heated Wintergarden and the open shutters that lead into the Wintergarden. Wind drafts can lead into respiratory issues. An solution for this problem is an even pressure ventilation system when the shutters are open. Another challenge can be the performance of the normal IB vaccination strategy. In Holland the most per-

formed strategy is a first day (hatchery or on farm) prime vaccination followed by a booster vaccination at day 14 on the farm. The performance of the first day vaccination in the hatchery or on the farm is good manageable. However the booster vaccination at day 14 is more challenging. Too much light due to the daylight windows and or the ventilators/inlet causes the more anxious breed to run for the spray vaccination. Moreover Less birds per square meter make it even more challenging.

*Marek:*

The Dutch market is due to the transition a semi integrated market (cost efficient) the costs for in ovo vaccination is approximately 6,5ct per animal. No Marek vaccination is normal practice. This strategy was without any problems in the conventional 6 weeks lifecycle. The longer lifecycles of the slow growing broilers give in a number of farms Marek problems due to longer built up of Marek viruses in a cycle. The first signs were a typical for Marek. Botulism like transient paralysis of the neck. Most Marek problems is poultry dense area's and multi-aged farms. The challenges by Marek prevention: the virus is in dust very persistent and is several infectious months at 20-25 degrees and years at 4 degrees. As a solution is in ovo vaccination strategy (HVT and or Rispens). In addition is crucial cleaning and proper disinfection. In search of an early diagnosis a trial PCR testing the dust at the end of the production cycle of Marek problem houses and houses without Marek problems. Showed no quantitative differences between the two groups. SB1 Marek virus was found in the dust of both category houses (50% of tested houses). The relevance of these findings is unsure. In conclusion of this trial a Marek diagnosis should still be done by virus isolation from infected animals and microscopic lesions.

*REO:*

Last year revitalization of confirmed REO diagnosis, more in slow growing breed than conventional. The clinical signs of an early infection an uneven Herd, more leg problems (spread leg), very low feed intake, tenosynovitis and signs of immunosuppression. The found isolates in 2023 are of genotype 1,2 and 4.

More than 80 herds of broiler breeders in the Netherlands in the first half year 2023 are checked for Reo virus titres at the end of rear. For a good maternal AB protection in offspring: 75% of the titres should be titre group 7 or higher. A rather high number of herds tested do not meet these demands. Furthermore the cross protection of maternal antibody's with genotype 4 virus is unknown.

On farm prevention of Reo virus persistence is cleaning and disinfection. Degreasing is the most important step preferably with caustic soda or a good foaming agent and use warm water. The disinfection preferably with formaldehyde. A good cleaning check-up is the performance of a VIR- check: 5 different persistent viruses tested performed at cloacal swab 7 days old chick (10 samples). Other integral solutions are: Accurate vaccination of Broiler Breeders (Titre check and 3 vaccination strategy), cleaning and disinfection in the hatchery. Contamination prevention management hatchery.

### *Gumboro*

Since 2014 genetic changes in vv IBD field strains the Netherlands, since 2017 is the DV86 vvIBD field strain found. The most recent strain found in the Netherlands is 98,1% DV86 vv IBD field strain. The new vvIBD strain acts like a subclinical strain, due to prolonged severe Bursa damage without acute mortality. The breakthrough titre is very high (>Elisa 1000) therefore the virus can cause an infection before a live vaccine is applicable. Conclusion: cleaning and disinfection is crucial, so no virus is already present in the house by chick placement.

### *Conclusions and take home message*

Soya use is the negative factor in poultry meat, in relation to the carbon footprint. Land Use Change: a very high factor for Soya (Brazilian soya, 20 years calculation greenhouse gas effect caused by deforestation).

Slow growing market functions only if there is no choice for consumer.

NGO's are very powerful / sector has forgotten to positive promote themselves?

Proactive approach sector is needed in order to avoid imposed concepts. Which often are not better for the welfare of the animal and the farmer/sector.

## L'ALLEVAMENTO DEL POLLO DA CARNE A LENTA CRESCITA IN ITALIA

Scolari A.

*Laboratorio Vallerana Srl*

La produzione di polli a lenta crescita sta crescendo gradualmente in Italia e in tutti i paesi ad economia avanzata. Attualmente, nel nostro paese rappresenta l'8% delle carni avicole introdotte sul mercato, deve pertanto essere considerata ancora una produzione di nicchia, anche se l'aumento della sua incidenza è significativo e ha attirato l'attenzione di molti produttori.

I fattori che contribuiscono alla sua diffusione sono diversi ed eterogenei, in generale possono essere considerati l'espressione del maggior interesse che i consumatori dei paesi occidentali manifestano verso alcuni aspetti delle produzioni avicole alternative. Tra questi possiamo sicuramente trovare la sensibilità verso il benessere animale, la ricerca di maggior sapore e consistenza delle carni, la percezione di una maggior qualità produttiva, la propensione ad acquistare cibi prodotti localmente, con caratteristiche per certi aspetti paragonabili ai prodotti dell'artigianato.

Tutto questo fa sì che una parte dei consumatori, in genere appartenenti alle categorie più abbienti, sia disposta a pagare di più per prodotti che considerano più pregiati qualitativamente e maggiormente rispettosi di principi etici.

Dal punto di vista produttivo, in Italia possiamo dividere l'allevamento del pollo a lento accrescimento in tre macrocategorie:

Il pollo "rurale" vero e proprio: cioè l'allevamento di animali destinati all'autoconsumo, i cosiddetti polli da cortile. Gli allevatori di volatili da cortile si approvvigionano in mercati agricoli o direttamente negli allevamenti di «svezzatori», che a loro volta comperano i pulcini presso incubatoi, che gestiscono riproduttori appartenenti a diverse razze.

La realtà dei piccoli produttori: aziende piccole o medie che producono direttamente i polli in uno o in pochi allevamenti, solitamente non operanti con la modalità del "tutto pieno – tutto vuoto". La macellazione avviene in un piccolo macello aziendale o in un macello locale.

L'allevamento industriale del pollo a "lento accrescimento": riguarda tutte quelle produzioni realizzate da grandi filiere, che propongono un prodotto alternativo al broiler standard. I soggetti sono solitamente allevati con il sistema «tutto pieno – tutto vuoto» e i prodotti sono reperibili anche nella Grande Distribuzione Organizzata.

Sono tante le razze e gli incroci che possono essere utilizzati nell'allevamento del pollo a lenta crescita, con una grande varietà di dimensioni, forme e colori. Una varietà che si contrappone all'uniformità delle razze a rapido accrescimento e che fornisce gli imprenditori un interessante strumento di differenziazione delle strategie produttive.

Di fatto, uno degli aspetti che maggiormente colpisce nel settore dei polli da carne a lenta crescita, è proprio la possibilità di diversificare i prodotti in base a precisi parametri produttivi, che suscitano l'interesse del consumatore e che sono ben definiti nel Decreto 29 luglio 2004 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MiPAF). (1) Tale Decreto, rappresenta la base giuridica di un robusto sistema di certificazione, gestito da un'associazione di produttori (Unaitalia), seguendo le disposizioni di un Disciplinare (IT001EA), approvato dal Ministero dell'Agricoltura della Sovranità Ali-

mentare e delle Foreste (MASAF) e la cui applicazione è sottoposta al controllo di un ente terzo accreditato, il CSQA.

Le norme contenute nel Disciplinare regolamentano integralmente il sistema di certificazione. È prevista l'esecuzione di Audit, attraverso un Piano di Controlli anch'esso approvato dal MASAF. Le carni immesse in commercio sono tracciate a partire dagli allevamenti. L'etichettatura è approvata da Unaitalia e sono previste una serie di misure per gestire eventuali non conformità, ivi compresa l'espulsione dell'aderente.

Il MASAF riceve con cadenza annuale una relazione sull'andamento dell'intero sistema di certificazione.

I parametri produttivi certificabili sono descritti nella **Tabella 1** e le garanzie sulla loro veridicità e tracciabilità sono un vero e proprio pilastro portante del sistema, il cui successo negli anni è dimostrato dal fatto che nel 2022, il 62% della produzione avicola nazionale è stata immessa sul mercato con informazioni volontarie certificate aggiunte in etichetta. (Fonte Unaitalia)

È importante sottolineare che il 28% di queste informazioni riguardava il maggiore benessere degli animali allevati, come l'uso di luce naturale e l'utilizzo di arricchimenti ambientali per favorire i comportamenti naturali dei volatili, oppure l'utilizzo in allevamento di razze a lento accrescimento. In particolare, la percentuale di adesione a quest'ultimo requisito è triplicata negli ultimi due anni. (Fonte Unaitalia)

**Tabella 1:** informazioni per il consumatore che possono essere dichiarate sull'etichetta dei prodotti avicoli. D.M. 29 luglio 2004.

Informazione	Requisito Disciplinare	Note
Alimentazione	A. Alimentazione NO OGM	Se presenti: B+C = Alimentazione Vegetale; A+B+C: Alimentazione Vegetale No OGM
	B. Alimentazione priva di farine animali	
	C. Alimentazione priva di grassi animali aggiunti	
	H. % di ... nella razione alimentare	
Forma di allevamento	D. Allevamento all'aperto	
	E. Allevamento estensivo al coperto	
	F. Allevamento rurale all'aperto	
	G. Allevamento rurale in libertà	
Altre dichiarazioni	I. Età minima alla macellazione ... giorni o di età non inferiore a .... giorni	
	J. Genotipo a lento accrescimento o a lenta crescita	Solo se il Genotipo rientra in quelli con prescrizioni sulle modalità di allevamento inserite nell'autorizzazione ministeriale
	K a) Maggior spazio in allevamento (rispetto ai limiti di legge)	< 33 Kg/m <sup>2</sup>
	K b) Più libertà di movimento grazie a maggior spazio in allevamento	≤ 30 Kg/m <sup>2</sup>
	L. Arricchimenti ambientali	
	M. Disponibilità/uso di luce naturale/solare	

*Dati Unaitalia*

I genotipi che possono essere utilizzati all'interno del sistema di certificazione, devono essere autorizzati dal MASAF (su richiesta fatta da Unaitalia), il quale si avvale del parere del Consiglio per la Ricerca in Agricoltura (CREA). Con iter sovrapponibile, questi stessi genotipi possono essere autorizzati anche per la produzione biologica.

Attualmente sono autorizzati 20 genotipi. I produttori avicoli hanno quindi a disposizione un'ampia gamma di razze che si distinguono per forme, colori, dimensioni e aspetti fisici (ad esempio, il collo nudo), con la conseguente possibilità di diversificare strategie produttive e di marketing.

Una caratteristica importante da considerare è la velocità di crescita. In base a questa caratteristica si possono sostanzialmente suddividere i genotipi autorizzati in due categorie: razze a lentissima crescita (33-37 grammi al giorno), e razze a crescita intermedia (45-49 grammi al giorno), in entrambi i casi valutate a 70 giorni di età.

Nella **Tabella 1** sono inoltre incluse informazioni per il consumatore che riguardano altri aspetti, associati sia al benessere animale che alla qualità dei prodotti. Tra queste vale la pena di sottolineare che possono essere certificate diverse tipologie di allevamento, le quali, per l'ampia libertà che offrono, ben si adattano ad allevare animali più leggeri e tendenzialmente propensi al movimento.

Le razze a lenta crescita possono essere utilizzate anche per produrre in base ai requisiti dall' European Chicken Commitment, un insieme di norme riguardanti il benessere animale, più restrittive rispetto alla legislazione vigente. Tali norme sono state approvate dalle più importanti associazioni animaliste e un buon numero di produttori avicoli europei si è impegnato a metterle in atto entro il 2026.

Dal punto di vista comportamentale esistono significative differenze in allevamento tra razze a lento e rapido accrescimento. Tali differenze devono essere debitamente tenute in considerazione, adottando opportune **strategie gestionali** e idonee modifiche strutturali, per far sì che i bisogni naturali delle prime siano rispettati e che il loro benessere sia garantito.

In genere, gli animali a lenta crescita sono più attivi e attenti, razzolano con frequenza, esplorano l'ambiente con curiosità e si impegnano in comportamenti naturali, come ad esempio, il bagno di sabbia.

Inoltre, interagiscono maggiormente tra loro, pertanto la definizione delle gerarchie all'interno dei gruppi è più complessa, il che aumenta il rischio della comparsa di tensioni sociali.

Sono questi gli aspetti comportamentali che richiedono l'adozione delle specifiche strategie gestionali sopracitate, che si differenziano in parte da quelle utilizzate per i polli a rapida crescita. Alcuni esempi sono di seguito descritti:

occorre porre particolare attenzione alla temperatura delle pulcinaie all'accasamento.

Il peso inferiore dei pulcini li rende più sensibili alle basse temperature.

la maggior mobilità degli animali si evidenzia sin dai primi giorni. È importante circondare l'area della pulcinaia con recinzioni per evitare che i pulcini si allontanino dalle fonti di calore.

le razze a lenta crescita sentono meno lo stimolo della fame rispetto a quelle a rapido accrescimento. Inoltre, per la loro naturale curiosità e per la tendenza al razzolamento, sono portate ad ingerire sostanze di scarso valore nutritivo, con conseguente penalizzazione del tasso di crescita giornaliero, in esse già ridotto dalle caratteristiche genetiche. Pertanto, particolare attenzione deve essere posta a favorire l'assunzione del mangime, la cui granulometria deve risultare attraente per l'animale durante tutte le fasi della crescita.

L'utilizzo di arricchimenti ambientali è fondamentale per il benessere delle razze a lenta crescita, in relazione la loro naturale tendenza alla mobilità. Per favorire la mobilità verticale si utilizzano solitamente balle di paglia o trespoli.

La forte intensità luminosa e l'aumento del fotoperiodo, favoriscono la conflittualità, che è naturalmente presente nelle razze a crescita lenta. L'utilizzo di teli ombreggianti e la presenza di vegetazione nei parchetti all'aperto possono ridurre i casi di pica e cannibalismo.

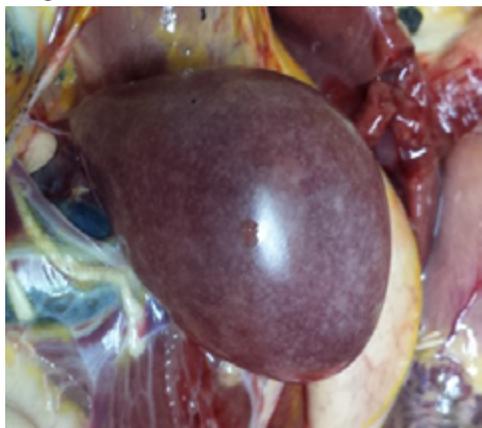
I programmi vaccinali non differiscono in genere da quelli utilizzati per le razze a rapido accrescimento, anche se alcuni fattori suggerirebbero di applicare specifici piani di immunizzazione per alcune patologie, per ridurre il rischio della loro comparsa, come verrà specificato in dettaglio nei successivi paragrafi. Tra questi fattori troviamo la maggior durata del ciclo produttivo nei polli a lenta crescita, oppure il maggior utilizzo di strutture allevatoriali meno adatte alla prevenzione delle malattie (allevamenti in multietà).

Le **patologie** che colpiscono i polli a lenta crescita non si discostano molto da quelle dei polli a rapido accrescimento. In generale, la maggior robustezza dell'apparato locomotore e del sistema cardio-respiratorio, li rendono meno sensibili alle diverse cause di zoppia e meno colpiti da fenomeni congestizi di varia natura.

Tutto questo si traduce in una minor percentuale di mortalità a fine ciclo, che normalmente si aggira intorno al 2—2,5%, contro il 3-5% delle razze a rapido accrescimento. Vale tuttavia la pena di sottolineare alcune differenze, da collegare in parte alla maggior durata del ciclo produttivo, a ben definite caratteristiche comportamentali degli animali o ad aspetti strutturali degli allevamenti.

In particolare, durante il ciclo produttivo di polli a lenta crescita, possono manifestarsi neoplasie al fegato, alla milza (**Figura 1**) e allo stomaco ghiandolare causate dal virus della Malattia di Marek, che può portare anche alla comparsa di neoplasie cutanee, riscontrate solitamente al macello. I fattori che favoriscono l'insorgenza di questa malattia sono la macellazione in età più avanzata e, in alcuni allevamenti, la mancanza del vuoto sanitario. Per contrastarla, sono di sicura utilità i miglioramenti in allevamento delle procedure di pulizia/disinfezione e della biosicurezza. In alcune aree ad alta densità, il ricorso alla doppia vaccinazione in incubatoio, con i ceppi HVT e Rispens deve essere seriamente preso in considerazione.

**Figura 1:** Malattia di Marek. Neoplasia alla milza in polli da carne a lenta crescita di 70 giorni di età.



Si sono verificati a partire dall'estate del 2023 anche alcuni episodi di Artrite Virale da reovirus. Sono comparsi con maggior frequenza in allevamenti nei quali non si praticava il vuoto sanitario. In questi allevamenti sono frequenti le infezioni precoci, che incidono maggiormente sui tessuti tendinei, la conseguente tenosinovite (Figura 2), si manifestava in genere solo nei soggetti maschi e poteva essere riscontrata solo al macello nei casi di lieve entità.

In episodi di maggior gravità, si raggiungeva in alcuni capannoni la prevalenza del 20%, con aumento delle zoppie e con conseguente riduzione dell'accrescimento.

La diffusa presenza della malattia sul territorio, riscontrata anche in gruppi provenienti da riproduttori correttamente vaccinati nei confronti dell'Artrite Virale, ha fatto ipotizzare l'esistenza di varianti diverse dal ceppo classico 1133 utilizzato nei vaccini, verso le quali la protezione poteva essere non completa.

Negli anni 2022 e 2023, l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie ha confermato la presenza in Italia di diversi Clusters del reovirus dell'Artrite Virale (comunicazione personale), tra i quali il Cluster 4, il più diffuso in Europa (2). Si sta cercando di prevenire questa patologia, migliorando il programma vaccinale dei riproduttori per potenziare l'immunità materna dei pulcini.

**Figura 2:** tenosinovite al tendine del gastrocnemio in un in un pollo a lenta crescita di 90 gg. di età.



Anche su altre patologie è importante sottolineare alcune differenze esistenti tra razze a lento e a rapido accrescimento.

In ambito intestinale, ad esempio, le clostridiosi, sia quelle sostenute da *C. perfringens*, che quelle, meno gravi sostenute da altri clostridi, tendono a provocano maggiori danni nei polli a lenta crescita, soprattutto per la loro tendenza a ridurre ulteriormente il consumo di mangime in presenza di stati di malessere, con la conseguente diminuzione dell'accrescimento.

Questo atteggiamento degli animali, richiede che venga posta particolare attenzione anche ad altre patologie che possono colpire l'apparato intestinale in forma subclinica (ad esempio le coccidiosi, spesso associate a clostridiosi di varia eziologia), che tolgono energie e appetito a un animale già di per sé poco propenso ad assumere alimenti e a crescere. Per questo motivo è importante che la vaccinazione per la coccidiosi venga eseguita correttamente; vi sono infatti alcuni fattori, caratteristici dell'allevamento a lenta crescita, come ad esempio la minor densità o la dispersione degli animali, possono rendere problematica l'assunzione di oocisti vaccinali dall'ambiente e il conseguimento di una robusta e uniforme immunità di gregge, la cui assenza può dare origine alle patologie intestinali sopra descritte, particolarmente subdole per la loro scarsa rivelabilità. Il rischio insito in questi casi è che il danno provocato si protragga nel tempo, diventando alla lunga superiore a quello di malattie più gravi, che proprio per la loro visibilità, vengono prontamente affrontate e risolte.

Anche alcuni virus che colpiscono l'apparato respiratorio, come il Metapneumovirus, oppure il sistema immunitario come il virus della Bursite Infettiva, possono indurre più facilmente depressione in razze a lento accrescimento, sempre per la loro minor propensione ad assumere alimenti in presenza di lievi episodi di malessere, ai quali occorre pertanto prestare la massima attenzione.

A livello sottocutaneo, val la pena di sottolineare la maggior incidenza nelle razze a lenta crescita della Bursite Sternale, dovuta alla conformazione appuntita del petto, che riduce la superficie di appoggio dell'animale in decubito sternale sulla lettiera.

Infine, sono più frequenti in queste razze i decessi per cause traumatiche, dovuti a episodi di pica/cannibalismo (per conflittualità sociale) o a predazione (in allevamenti all'aperto).

Se la produzione dei polli a lenta crescita, nonostante l'interesse dei produttori e dei consumatori, rimane un fenomeno di nicchia, lo si deve soprattutto al maggior costo di produzione dovuto alla minor produttività. Questa, a sua volta, influenza negativamente la sostenibilità ambientale di questo settore, un aspetto non di secondaria importanza.

Il problema è stato studiato da associazioni di produttori europee e americane (AVEC e National Chicken Council) che hanno quantificato le differenze tra i sistemi produttivi a rapida e lenta crescita.

Riassumendo il corposo lavoro pubblicato da AVEC, si può calcolare che, allevando animali a lenta crescita, il costo di produzione di un Kg di carne è destinato ad aumentare del 37,5%, e la produzione annuale di un metro quadrato di superficie è destinata a diminuire del 44%, mentre il consumo di acqua e di mangime sono destinati a crescere del 34,5%. In questo modo, le emissioni di gas serra crescono del 24,5%.

Il Dipartimento per gli Studi Ambientali dell'Università di New York ha dichiarato che, mantenendo inalterato il consumo, se i 20 milioni di tonnellate di carne di pollo annualmente prodotti dagli Stati Uniti provenissero tutti da allevamenti a lenta cresci-

ta, dovrebbero essere allevati più polli (da +44,6% – +86,8% a seconda del tipo di allevamento) e macellati più polli (+19,2% – +27,2%).

Se fossero prodotti in allevamenti estensivi al coperto, occorrerebbe una superficie di 90.582–98.687 km<sup>2</sup>, con un aumento del 19,9–30,6% rispetto ai 75.577 km<sup>2</sup> di terreno utilizzati per l'attuale produzione di polli a rapida crescita.

Mentre, se fossero prodotti in allevamenti rurali all'aperto, con i requisiti della Certificazione Humane Farm Animal Care (ca. 10 m<sup>2</sup> / soggetto), richiederebbero l'utilizzo di 108.642–121.019 km<sup>2</sup>, un aumento del 43,8–60,1% rispetto all'attuale utilizzo del suolo.

In **conclusione** si può senz'altro affermare che la produzione del pollo a lenta crescita deve essere considerata una importante opportunità in avicoltura, può consentire infatti di immettere sul mercato carni avicole in grado di attirare l'interesse di un numero crescente di consumatori, per le loro caratteristiche qualitative e per il maggior livello di benessere degli animali che le producono.

Inoltre, la legislazione esistente, le diverse tipologie di certificazione, l'applicazione dei loro rispetti disciplinari produttivi sotto il controllo di enti terzi e delle autorità preposte, permettono di dare al consumatore informazioni chiare, precise e credibili sulle caratteristiche qualitative dei prodotti.

Il maggior valore aggiunto dei prodotti e la rusticità degli animali, consentono oltretutto di produrre in piccoli allevamenti situati in zone disagiate dal punto di vista produttivo.

E, pur essendo ancora un mercato di nicchia, è senz'altro in grado migliorare l'immagine che il cittadino medio ha delle produzioni avicole, non per caso infatti, sta gradualmente crescendo in tutta Europa.

Tuttavia, per mantenere la capacità produttiva e la sostenibilità dell'avicoltura europea, è fondamentale impedire che questa crescita avvenga seguendo le leggi di mercato e non sia imposta da regolamenti, decreti o da lobby di potere.

Infatti, anche se sappiamo che una eventuale imposizione a utilizzare in avicoltura esclusivamente razze a lenta crescita avrebbe ricadute positive sul benessere dei polli, non possiamo dimenticare le conseguenze negative sull'ambiente che questo tipo di produzioni comporta e soprattutto, le ricadute negative su uno degli aspetti più importanti per la società in generale, il soddisfacimento dei bisogni primari: anche le classi meno abbienti, in Italia e nel mondo, devono avere la possibilità di acquistare alimenti ad alto valore biologico a prezzi accettabili.

Sappiamo infatti che la capacità produttiva delle razze a lenta crescita è significativamente inferiore a quella delle razze a rapido accrescimento (si perderebbero circa 30 anni in termini di produttività) e sappiamo anche che il prezzo di vendita delle carni avicole, in caso di forte riduzione dell'offerta, può aumentare, per dinamiche di mercato, ben più di quanto si possa prevedere in base al solo aumento dei costi di produzione.

Pertanto, è importante che i consumatori siano informati in modo corretto ed equilibrato su tutte le caratteristiche delle diverse produzioni avicole, in modo che possano consapevolmente e liberamente scegliere il prodotto da acquistare, sia in base alle loro possibilità economiche che a scelte fatte per motivi etici. Il benessere dei polli allevati è importante, ma non può però essere valutato senza tenere in considerazione la necessità di alimentare il mondo evitando gli sprechi di risorse.

Ma purtroppo, su questi aspetti, nella società occidentale l'informazione al consu-

mature è monopolizzata dalle associazioni animaliste, coadiuvate da programmi televisivi di giornalismo investigativo, e l'informazione che insieme forniscono è parziale, non equilibrata, deformata da ideologie e non scientificamente corretta.

### **RINGRAZIAMENTI**

Si ringraziano i colleghi Carlo Castellina, Simona Ceroni, Alberto Dall'Angelo, Luigi Gavazzi, Elisa Russo, oltre a Rossella Pedicone (Unaitalia), che hanno fornito importanti informazioni utili a completare la stesura del presente articolo.

### **RIFERIMENTI**

1. Decreto 29 luglio 2004 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Modalità' per l'applicazione di un sistema volontario di etichettatura delle carni di pollame. Gazzetta Ufficiale n. 241 del 13-10-2004.
2. Identification of the main genetic clusters of avian reoviruses from a global strain collection. Kovács et al., Front. Vet. Sci., 12 January 2023 , Volume 9-2022 <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1094761>.
3. Costs and implications of the European Chicken Commitment in the EU. A report prepared by RSK ADAS Ltd. AVEC. March 2024
4. The 'sustainability gap' of US broiler chicken production: trade-offs between welfare, land use and consumption. Iris Chan, Becca Franks and Matthew N. Hayek. Department of Environmental Studies, New York University, New York, NY, USA. Royal Society of Open Science. 2022



**ATTI DEL IX SIMPOSIO SCIENTIFICO**

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Lodi (LO), 12/13 Settembre 2024

# SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN ARRAY DI REAL-TIME RT-PCR PER LA RAPIDA PATOTIPIZZAZIONE DEL PARAMYXOVIRUS AVIARIO DI TIPO I (APMV-1)

Fortin A.<sup>1</sup>, Laconi A.<sup>2</sup>, Monne I.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>3</sup>, Crimauco M.<sup>1</sup>, Valastro V.<sup>1</sup>, D'Amico V.<sup>1</sup>, Bortolami A.<sup>1</sup>, Gastaldelli A.<sup>1</sup>, Varotto M.<sup>1</sup>, Terregino C.<sup>1</sup> e Panzarin V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Legnaro (PD)*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Biomedicina Comparata e Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Padova (Unipd), Legnaro (PD)*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova (Unipd), Legnaro (PD)*

## Summary

Avian Paramyxovirus type 1 (APMV-1) infects a wide range of bird species globally, showing significant variability in pathogenicity. The study aimed to develop a rapid and accurate RT-qPCR array to distinguish between virulent and avirulent strains of APMV-1 to help control Newcastle disease, a significant economic problem due to its impact on poultry. The researchers developed three sets of targeted oligonucleotides covering all the different genotypes and validated the RT-qPCR array, confirming the results by sequencing the same amplicon. The tests showed high specificity without cross-reactivity and high sensitivity for most genotypes, although subject to the high genetic variability of the virus. The tests were consistently accurate in all repetitions and clinical samples were correctly identified and pathotyped. An inter-laboratory study confirmed the reproducibility of the RT-qPCR array making it a reliable tool for rapid and accurate pathotyping of APMV-1. This advancement improves the diagnosis and control of Newcastle disease and has potential to differentiate infected from vaccinated animals.

## INTRODUZIONE

Gli Avian Paramyxovirus di tipo 1 (APMV-1), appartenenti al genere Avian orthoavulavirus 1 (AOaV-1), infettano oltre 240 specie di uccelli domestici e selvatici in tutto il mondo (Absalón et al., 2019; Hicks et al., 2019). Questi virus mostrano una notevole variabilità di patogenicità, che può variare da infezioni subcliniche a malattie acute con alta mortalità. La classificazione dei ceppi di APMV-1 come velogenici (altamente virulenti), mesogenici (virulenza intermedia) o lentogenici (poco patogeni) si basa sull'indice di patogenicità intracerebrale (ICPI) nei polli di un giorno di vita. Recentemente, Dimitrov et al. (2019) hanno proposto una classificazione filogenetica basata sulla variabilità del gene della proteina di fusione che suddivide gli APMV-1 in due classi e 21 genotipi, con la classe II che mostra la maggiore variabilità genetica, includendo virus velogenici, mesogenici e lentogenici. I ceppi velogenici e mesogenici sono riconosciuti come cause della malattia di Newcastle (ND), una malattia di grande importanza economica a livello globale per l'elevata mortalità del pollame e l'impatto delle misure di controllo necessarie per limitare la diffusione dell'infezione.

Per questo motivo l'identificazione rapida e accurata dei casi di ND è essenziale per implementare tempestivamente misure di controllo dei focolai. Oltre alla diagnosi basata su ICPI le tecniche di biologia molecolare come le metodiche di PCR e il sequen-

ziamento del sito di clivaggio del gene della proteina di fusione (F0) (Commission Delegated Regulation (EU) 2020/689, 2019; WOA, 2021) oggi sono molto diffuse perché permettono di ottenere risultati rapidamente e con meno problemi etici rispetto alle tecniche in vivo. Tuttavia questo approccio diagnostico incontra l'ostacolo della diversità genetica degli APMV-1, favorita sia dalla loro ampia diffusione che dalla pressione immunitaria esercitata dai vaccini, che complica la diagnosi. Questa alta variabilità rende difficile sviluppare sonde che discriminino efficacemente tra ceppi virulenti e avirulenti. Studi precedenti hanno tentato di migliorare la sensibilità e specificità di questi saggi, ma le varianti emergenti di APMV-1 hanno mostrato prestazioni subottimali (Wise et al., 2004; Kim et al., 2006; Fuller et al., 2009).

Questo studio mira a sviluppare un array di RT-qPCR che consenta una patotipizzazione rapida e accurata degli APMV-1, distinguendo tra virus virulenti e avirulenti, indipendentemente dal genotipo. Le sonde specifiche per i patotipi virulenti e avirulenti, insieme al sequenziamento Sanger, promettono di migliorare la diagnosi e il controllo della malattia di Newcastle, contribuendo a ridurre l'impatto globale della ND.

## MATERIALI E METODI

### *Analisi in silico e sviluppo delle realtime PCR dell'array*

A seguito di una analisi *in silico* comprendente tutti e genotipi di entrambi le classi del virus AMPV-1 sono stati sviluppati tre set indipendenti di oligonucleotidi riportati in Tabella 1 con sonde marcate tramite fluorofori differenti in base al patotipo aventi come target la regione del sito di clivaggio della proteina F. Il SET A si rivolge ai virus di classe II genotipi I-IV, IX-XI; il SET B ai virus di classe II genotipi V-VIII, XII-XXI; il SET C identifica l'APMV-1 lentogeno di classe I. La lunghezza dei prodotti di PCR (149-218 bp) consente il sequenziamento Sanger del sito di clivaggio per confermare il patotipo.

Set	Oligonucleotide	Sequenza 5'- 3'
A	Class II A for	CTC ACC CCY CTT GGT GA
	Class II A rev	GGA GRA TGT TGG CAG CAT T
	Class II A avir MGB probe	FAM-CCT ATA AGG CGY CCC TGT YTC-MGB
	Class II A vir MGB probe	CY5-CCT AYA AAG CGT YTC TGY CTC C-MGB
B	Class II B for	GAR GCA TAY AAC AGA ACA
	Class II B rev	GTY GCA ACC CCR AGA GCT A
	Class II B avir MGB probe	FAM-GAR ACA GGG ACG YCT TAT AGG-MGB
	Class II B vir MGBa probe	CY5-ARA CGC TTY ATA GGT GC-MGB
C	Class I C for	CMG GGA CAA TTA TCA TCA A
	Class I C rev	GGC TAC ACC TAA TGC GA
	Class I C MGB probe	FAM-CAG GAG CGK TTG RTA GG-MGB

**Tabella 1.** Primers e sonde patotipo-specifiche per classe I e classe II.

Come indicato nella Tabella 2 le tre RT-rPCR seppur con diversi volumi di oligo ottimizzati per ciascun set utilizzano il medesimo kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) usando 5 µl di RNA in una miscela di reazione da 25 µl totali. L'array è stato validato sulla piattaforma realtime QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) che permette la corsa simultanea di più reazioni con temperature di annealing diverse. I prodotti di PCR sono stati verificati tramite elettroforesi capillare automatica con il sistema QIAxcel Advanced (Qiagen, Hilden, Germany) e sequenziati tramite sequenziatore automatico 3130xl (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Set	Concentrazione oligonucleotidi	Ciclo termico
A	1 µM primers, 300 nM sonde	50°C 5 min; 95°C 20 sec; 45 × [95°C 30 sec, 60°C 45 sec]
B	1 µM primers, 250 nM sonde	50°C 5 min; 95°C 20 sec; 45 × [95°C 30 sec, 55°C 45 sec]
C	900 nM primers, 250 nM sonda	

**Tabella 2.** Parametri delle tre RT-rPCR.

### *Specificità analitica*

Un pannello di 66 isolati di APMV-1 virulenti e avirulenti di diversi genotipi è stato testato per valutare l'inclusività dei saggi RT-qPCR e la definizione del patotipo. L'esclusività, invece, è stata verificata con 47 isolati di batteri e virus non target di specie avicole. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato e con tutti e tre i saggi simultaneamente.

### *Limite di rilevazione (LOD) e ripetibilità*

L'omogenato polmonare ottenuto da polli SFP è stato utilizzato per effettuare diluizioni seriali di 15 isolati di APMV-1 di vari genotipi per simulare i campioni clinici. In seguito ogni diluizione è stata testata in triplicato per determinare il LOD e confrontare la sensibilità con il metodo di screening parallelo in uso presso il laboratorio (Sutton et al., 2019). La ripetibilità quindi è stata testata con diluizioni ad alti e bassi titoli virali di 5 isolati rappresentativi, analizzate in triplicato in tre giorni diversi da due operatori.

### *Prestazioni diagnostiche*

Per valutare le prestazioni diagnostiche dei saggi RT-qPCR, sono stati utilizzati campioni clinici con reattività nota. Il pannello includeva 59 campioni noti positivi di APMV-1 di diversi genotipi e 67 campioni negativi per APMV-1. Tutti i campioni sono stati analizzati con i tre saggi di patotipizzazione in parallelo, il sequenziamento Sanger dell'amplicone ottenuto e attraverso la RT-qPCR di screening di Sutton et al. (2019).

### *Riproducibilità*

La riproducibilità dell'array è stata valutata tramite un esercizio interlaboratorio che ha coinvolto l'IZSVe, il Swedish National Veterinary Institute (SVA) e il Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) per valutare la riproducibilità dell'array RT-qPCR. Ai tre laboratori è stato fornito un pannello di 11 campioni in cieco insieme ai reagenti di amplificazione

necessari. Ogni laboratorio ha utilizzato metodi di estrazione degli acidi nucleici e piattaforme realtime in uso presso le loro strutture. I Cq ottenuti sono stati utilizzati in seguito per valutare l'accordo tra i laboratori tramite la kappa di Fleiss.

## **RISULTATI**

### *Specificità analitica*

Tutte le tre PCR realtime si sono dimostrate specifiche, senza alcuna evidenza di reazione incrociata contro i componenti della matrice o i microrganismi aviari non bersaglio. Al contrario, tutti gli isolati di APMV-1 di classe I e II che rappresentano i genotipi I, I, II, VI, VII, XIII, XIV, XVIII, XXI sono stati individuati e patotipizzati correttamente. Alcuni isolati di classe II hanno reagito sia con il SET A che con il SET B, indipendentemente dai genotipi target dei set, ma ciò non ha compromesso la corretta patotipizzazione. Non è stato possibile testare altri genotipi in questa fase in quanto non disponibili in laboratorio.

### *Limite di rilevazione (LOD)*

La sensibilità analitica è stata individuata minore o uguale di  $10^{2.83} \text{EID}_{50}/100\mu\text{l}$  per 9 dei 10 genotipi virulenti o avirulenti analizzati. Come previsto, solo il ceppo APMV-1/chicken/California/18-016505-1/2018 ha prodotto un LOD di  $10^{4.62} \text{EID}_{50}/100\mu\text{l}$ . Questo campione rappresenta il genotipo V.1 che circola quasi esclusivamente in Nord America e in America Latina (Absalón et al., 2019). Una verifica in silico ha evidenziato un mismatch nella regione di ibridazione del primer forward del SET A; questo mismatch causa un forte calo della temperatura di melting del primer, che molto probabilmente ha influito sulla sensibilità del test.

L'efficienza e l' $R^2$  di tutti i genotipi testati sono risultati entro valori accettabili (Bustin et al., 2009). Inoltre tutti i campioni utilizzati per la sensibilità analitica sono stati patotipizzati correttamente a qualsiasi diluizione testata. Infine, il LOD della RT-qPCR di screening eseguita per confronto è risultato più basso di  $1 \log_{10}$ , tranne che per il ceppo vaccinale VG/GA che è stato rilevato con una maggiore sensibilità dal SET A.

### *Ripetibilità*

Tutte le repliche e le ripetizioni analizzate per la valutazione della riproducibilità sono risultate positive e hanno fornito il patotipo corretto. Alla massima concentrazione di virus, la %CV complessiva intra- e inter-test era rispettivamente  $\geq 3,2$  e  $4,9$ . Al LOD, la ripetibilità è stata leggermente inferiore con un coefficiente di variabilità tra  $2,9\%$  e  $6,7\%$ , sebbene la patotipizzazione non sia stata compromessa né dal riconoscimento delle sonde né dal sequenziamento Sanger del prodotto di amplificazione.

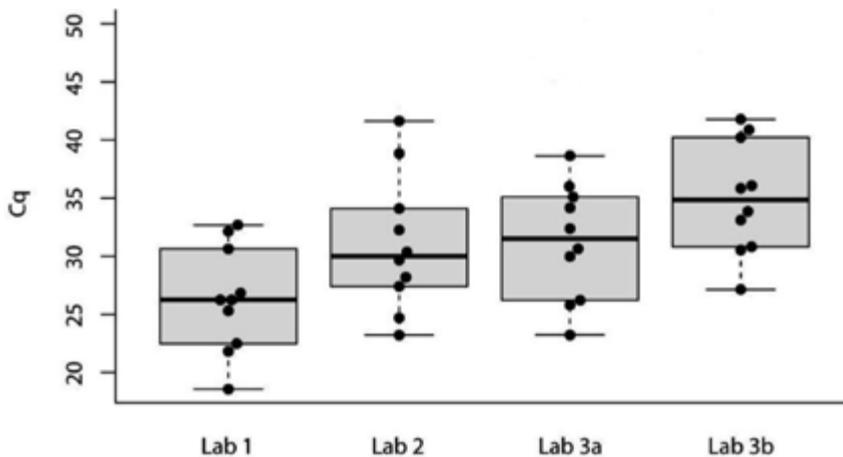
### *Prestazioni diagnostiche*

Tutti i campioni positivi all'APMV-1 raccolti da pollame e uccelli selvatici sono stati individuati con l'array di RT-qPCR e patotipizzati correttamente. I campioni rappresentano i genotipi I, II, VI, VII, XIII, XIV, XVIII, XXI di diversi Paesi del continente europeo, asiatico e africano. A causa della mancanza di campioni provenienti dalle Americhe e da Paesi asiatici diversi da Giordania e Bangladesh, non è stato possibile validare i saggi RT-qPCR sui genotipi circolanti in queste aree. Come osservato durante la validazione analitica, diversi campioni hanno reagito in modo incrociato sia con il SET A che con il SET B, pur ottenendo una patotipizzazione corretta con entrambi

i saggi. Alcuni casi hanno mostrato valori di Cq elevati ( $\geq 40$ ), questo però non ha inficiato la corretta discriminazione virulento/avirulento. L'assenza di una relazione lineare con i valori di Cq ottenuti dal protocollo di screening suggerisce che la sensibilità dei SET A e B sia principalmente dipendente dal ceppo e solo in parte determinata dalla carica virale del campione. I prodotti di amplificazione di 8 di APMV-1 non hanno prodotto un cromatogramma di sequenza chiaro. D'altra parte, per 47 campioni è stato possibile ottenere anche la sequenza CS, confermando ulteriormente la corretta assegnazione del patotipo da parte delle sonde. In particolare, 4 campioni clinici di genotipo VI che non potevano essere patotipizzati direttamente con i protocolli RT-PCR sviluppati da Kant et al. (1997) e De Battisti et al. (2013) sono stati riconosciuti dai SET A e B. Di questi, 3 sono stati sequenziati con successo a valle della RT-qPCR.

### *Riproducibilità*

L'analisi parallela dei campioni di APMV-1 ha rivelato un accordo quasi perfetto tra i laboratori (kappa di Fleiss = 0,88; 95% CI: 0,64 - 1) (Nichols et al., 2010). Solo un campione è stato mancato dal laboratorio 2, mentre i restanti campioni sono stati individuati e patotipizzati correttamente da tutti i partecipanti. In particolare, i valori di Cq variavano significativamente tra i laboratori. Il laboratorio 1 ha mostrato valori di Cq sistematicamente più bassi rispetto ai laboratori 2 e 3 ( $p < 0,001$ ) (Figura 1). Il laboratorio 3 ha eseguito l'esercizio applicando diverse ramping durante il ciclo termico (1,6 e 3,5°C/s) rappresentate rispettivamente in figura 1 come a e b. Quattro campioni su 11 hanno prodotto Cq  $> 40$  e curve di amplificazione irregolari con la ramping più elevata. Diminuendo la velocità di variazione della temperatura fino a 1,6°C/s, si è ottenuta una migliore rilevazione e valori di Cq inferiori. Tutti i campioni inclusi nel pannello sono stati rilevati e classificati correttamente come virulenti o avirulenti, ottenendo un kappa di Cohen pari a 1.



**Figura 1.** Comparazione dei valori di Cq ottenuti dai diversi laboratori.

## CONCLUSIONI

Questo studio ha sviluppato e validato un array di RT-qPCR affidabile e inclusivo per la determinazione del patotipo di APMV-1 in campioni clinici. Le sonde specifiche, mirate al sito di clivaggio del gene F e marcate con diversi fluorofori, consentono di discriminare i virus virulenti da quelli avirulenti. La dimensione del prodotto di amplificazione permette la conferma del patotipo attraverso il sequenziamento Sanger. L'array, composto da una set di oligo per i virus di classe I e due set diversi per i ceppi di classe II, utilizza oligonucleotidi con maggiore affinità per i diversi genotipi, anche se le mutazioni possono ridurre la sensibilità, come dimostrato per il ceppo APMV-1/chicken/California/18-016505-1/2018. Durante i test su campioni clinici, la variazione dei valori di Cq rispetto alla RT-qPCR di screening di Sutton e colleghi non ha influenzato la corretta discriminazione dei virus, impedendo l'identificazione di un cut-off diagnostico univoco. È stata possibile la determinazione della sequenza del sito di clivaggio anche per campioni con valori di Cq elevati (35-39), permettendo così di confermare il patotipo di campioni con bassa carica virale. Questo approccio offre flessibilità ai laboratori in termini di attrezzature, conoscenze epidemiologiche e tempi di refertazione.

L'array di RT-qPCR può anche rilevare coinfezioni di virus virulenti e avirulenti, come dimostrato dal campione APMV-1/pigeon/Italy/21VIR1109-8/2021, che ha rivelato la presenza contemporanea di ceppi mesogenici e lentogenici. Questo indica che tale approccio può anche essere usato come strategia DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) per monitorare la circolazione di APMV-1 virulento negli animali vaccinati.

La riproducibilità e la trasferibilità del array, valutate durante il processo di validazione, hanno evidenziato che l'ottimizzazione delle impostazioni di amplificazione in base ai reagenti e agli strumenti utilizzati (ad esempio, sistema di acidi nucleici, kit di amplificazione, temperatura) è fondamentale ma è stata mantenuta la corretta assegnazione del patotipo dei campioni forniti. Pertanto, in conclusione, l'array di RT-qPCR sviluppato è adatto alla patotipizzazione molecolare dell'APMV-1 nei campioni clinici. È importante notare che la patotipizzazione molecolare potrebbe non essere sempre predittiva del reale potere patogeno di APMV-1, pertanto i test in vivo non dovrebbero essere completamente scartati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Absalón AE, Cortés-Espinosa DV, Lucio E, Miller PJ and CL Afonso. (2019). Epidemiology, Control, and Prevention of Newcastle Disease in Endemic Regions: Latin America. *Trop. Anim. Health Prod.* 51: 1033–1048.
2. Hicks JT, Dimitrov KM, Afonso CL, Ramey AM and J Bahl. (2019). Global Phylogenetic Analysis of Avian Paramyxovirus-1 Provides Evidence of Inter-Host Transmission and Intercontinental Spatial Diffusion. *BMC Evolutionary Biology* 19: 108.
3. Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, Briand F-X, Brown IH, Choi K-S, Chvala I, Diel DG, Durr PA, Ferreira HL, Fusaro A, Gil P, Goujgoulova GV, Grund C, Hicks JT, Joannis TM, Kim Torchetti M, Kolosov S, Lambrecht B, Lewis NS, Liu H, Liu H, McCullough S, Miller PJ, Monne I, Muller CP, Munir M, Reischak D, Sabra M, Samal SK, Servan de Almeida R, Shittu I, Snoeck CJ, Suarez DL, Van Borm S, Wang Z and FYK Wong. (2019).

- Updated Unified Phylogenetic Classification System and Revised Nomenclature for Newcastle Disease Virus. *Infect. Genet. Evol.* 74: 103917.
4. Commission Delegated Regulation (EU) 2020/689. (2019).
  5. WOAH Biotechnology Advances in the Diagnosis of Infectious Diseases (Version Adopted in May 2021). (2021). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022.*
  6. Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, Kapczynski DR and E Spackman. 2004. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* 42: 329–338.
  7. Kim LM, Afonso CL and DL Suarez. 2006. Effect of Probe-Site Mismatches on Detection of Virulent Newcastle Disease Viruses Using a Fusion-Gene Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Test. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 519–528.
  8. Fuller CM, Collins MS and DJ Alexander. 2009. Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for the Detection and Simultaneous Pathotyping of Newcastle Disease Virus Isolates Using a Novel Probe. *Arch. Virol.* 154: 929–937.
  9. Sutton DA, Allen DP, Fuller, CM, Mayers J, Mollett BC, Londt BZ, Reid SM, Mansfield KL and IH Brown. 2019. Development of an Avian Avulavirus 1 (AAvV-1) L-Gene Real-Time RT-PCR Assay Using Minor Groove Binding Probes for Application as a Routine Diagnostic Tool. *J. Virol. Methods* 265: 9–14.
  10. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55: 611–622.
  11. Kant A, Koch G, Van Roozelaar DJ, Balk F and AT Huurne. 1997. Differentiation of Virulent and Non-virulent Strains of Newcastle Disease Virus within 24 Hours by Polymerase Chain Reaction. *Avian Pathology* 26: 837–849.
  12. De Battisti C, Salomoni A, Ormelli S, Monne I, Capua I and G Cattoli. 2013. Rapid Pathotyping of Newcastle Disease Virus by Pyrosequencing. *J. Virol. Meth.* 188: 13–20.
  13. Nichols TR, Wisner PM, Cripe G and L Gulabchand. 2010. Putting the Kappa Statistic to Use. *The Quality Assurance Journal* 13: 57–61.

# SORVEGLIANZA PER INFLUENZA AVIARE IN VOLATILI SELVATICI IN REGIONE LOMBARDIA NEL PERIODO 2022-2024

Trogu T.<sup>1</sup>, Bellini S.<sup>1</sup>, Canziani S.<sup>1</sup>, Carrera M.<sup>1</sup>, Chiapponi C.<sup>1</sup>, Chiari M.<sup>2</sup>, Farioli M.<sup>2</sup>, Fusaro A.<sup>3</sup>, Nucci A.<sup>1</sup>, Soliani L.<sup>1</sup>, Bortolami A.<sup>3</sup>, Terregino C.<sup>3</sup>, Lavazza A.<sup>1</sup>, Moreno A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Uberтини" (IZSLER), Via Antonio Bianchi 7/9, 25124 Brescia, Italia;*

<sup>2</sup> *Direzione Generale Welfare, U.O. Veterinaria, Piazza Città di Lombardia 1 - 20124 Milano, Italia;*

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

## Summary

Influenza A virus can infect a wide range of susceptible species among birds and mammals, posing a global threat for animal and public health. In particular wild waterfowls are considered reservoir of both low (LPAIV) and high (HPAIV) pathogenicity influenza A viruses despite their virulence. This characteristic, combined with the fact that these birds can make long migratory routes and shed the virus in their faeces, not only allows the virus to spread to distant areas but also increases the frequency of viral co-infections and reassortments, which could lead to the emergence of new strains with different virulence and host tropism. For example, in the United States, an H5 HPAI virus belonging to the 2.3.4.4b clade has recently been isolated in dairy cattle, also posing a risk to public health. In this context, it is of paramount importance to arrange an integrated and effective surveillance system to early detect AIV circulation and to prevent infection in poultry and other animals with subsequent economic losses. In the Lombardy region, during the 2022-2024, in the framework of a target surveillance on Anatidae, samples were collected i.e. cloacal swabs from hunted birds and faecal samples from the ground within regional parks. In addition, following a passive surveillance approach, pools of organs (brain, lung and intestine) were collected from each wild bird found dead and conferred to Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER). Samples were analysed through real-time RT-PCR targeting the M gene, and positive samples were then subjected to real-time RT-PCR to identify H5 and H7 strains and full genome sequencing.

Screening of 3260 individual cloacal swabs from hunted Anatidae revealed a total of 159 positive samples (4.15% in 2022-23 and 5.47% in 2023-24). Complete sequencing was possible for 128 samples, highlighting the presence of 21 different subtypes from H1N1 to H12N5. The H5N1 HPAIV subtype, in particular clade 2.3.4.4b, was the most common in the 2022-23 winter season (32.3%) but was completely absent in the 2023-24 season. In contrast, the H5 LPAI strains were the most common (27%) in the 2023-24 season. Among the other subtypes, H3N8, H6N1, H6N3, H6N8 and H11N9 were the most frequently detected. The molecular survey on wild birds found dead (n=481) showed two positive buzzards in 2022 (14%, 2/14), one grey heron 5.5%, 1/18) and one kestrel in 2023 (7.6%, 1/13). Regarding to the order *Charadriiformes*, the dead gulls sampled were all negative in 2022 (17 birds), whereas 85 out of 167 individuals were positive in 2023 (51%). All positives were caused by an H5N1 HPAIV clade 2.3.4.4b virus belonging to genotype BB. All the faecal samples (1699) received from passive surveillance in nature parks were analysed for AIV with negative results.

The wave of H5N1 affecting both anatids and larids reflects the epidemiological situation present throughout Europe. Active surveillance in hunted anatids has identified a considerable variety of subtypes, highlighting great viral diversity and high levels of reassortment phenomena and mutations. This type of integrated surveillance, combining target surveillance with passive surveillance, is essential to monitor circulating influenza strains and to be able to take appropriate preventive measures to protect poultry farms and public health.

## INTRODUZIONE

I virus dell'influenza aviaria (AIV) sono in grado di diffondersi e replicarsi all'interno di una vasta gamma di specie animali, ostacolando in tal modo gli sforzi di eradicazione della malattia a livello globale. Ogni anno, vari ceppi di questi virus circolano ampiamente tra le specie di volatili selvatici, che fungono da serbatoi naturali in grado di trasmettere i virus ad altri uccelli domestici e selvatici e ad ospiti accidentali, tra cui diverse specie di mammiferi, compreso l'uomo (EFSA et al., 2023a; EFSA et al., 2023b, Global Avian Influenza Viruses with Zoonotic Potential Update). Durante le stagioni migratorie, l'AIV può diffondersi in nuovi territori e regioni, anche a notevoli distanze, rappresentando una minaccia significativa per la salute degli animali e dell'uomo. Gli uccelli acquatici selvatici appartenenti agli ordini *Anseriformes* e *Charadriiformes* sono i principali serbatoi di virus dell'influenza aviaria a bassa (LPAIV) e alta patogenicità (HPAIV), che possono essere trasmessi direttamente o indirettamente agli uccelli domestici. La via di trasmissione oro-fecale dei virus LPAI, insieme al loro tipico basso potere patogeno per gli uccelli acquatici, crea le condizioni ideali affinché possano verificarsi casi di coinfezione in grado di facilitare il riassortimento genetico con la conseguente nascita di nuovi genotipi.

L'ondata di focolai di HPAI, in particolare di virus H5 derivati dal ceppo A/Goose/Guangdong/1/1996 originario del sud-est asiatico, ha determinato un aumento della presenza della malattia in tutto il mondo (5, 6). In particolare, i virus H5 HPAIV del clade 2.3.4.4b sono caratterizzati da un'elevata capacità di riassortimento con i virus influenzali A presenti negli uccelli, determinando la comparsa di un elevato numero di genotipi diversi. Inoltre, questi virus hanno dimostrato una spiccata capacità di effettuare il salto di specie ed infettare un'ampia gamma di mammiferi domestici e selvatici, compreso l'uomo (EFSA et al., 2023a; EFSA et al., 2023b, Global Avian Influenza Viruses with Zoonotic Potential Update). Recentemente, sono state segnalate per la prima volta infezioni causate da virus di questo clade in diversi allevamenti di bovini da latte negli Stati Uniti, con conseguente pericolo di trasmissione all'uomo attraverso il contatto diretto con gli animali e l'ingestione di latte crudo (Burrough et al., 2024).

In questo contesto, è quindi essenziale sviluppare sistemi di sorveglianza dell'influenza aviaria (IA) nei volatili domestici e selvatici, sia a livello nazionale che regionale, con l'obiettivo principale di individuare precocemente la circolazione di virus dell'influenza A, H5 e H7, con particolare riguardo all'HPAIV, al fine di proteggere il pollame domestico e salvaguardare la salute umana e animale.

In particolare, il piano di sorveglianza dell'IA negli uccelli selvatici in Lombardia si basa su una sorveglianza attiva caratterizzata dalla raccolta di tamponi cloacali da anatidi cacciati e su una sorveglianza passiva con la raccolta di feci da anatidi nei parchi e da uccelli selvatici trovati morti. Nel presente lavoro vengono riportati i risultati della sorveglianza integrata (attiva e passiva) negli uccelli selvatici in Lombardia, nell'ambito dei programmi regionali di sorveglianza della fauna selvatica e dell'influenza aviaria.

## MATERIALI E METODI

### *Raccolta di campioni*

Sorveglianza attiva degli anatidi cacciati: Sul territorio di competenza della Regione Lombardia è stata condotta un'analisi del rischio che ha preso in considerazione il georeferenzamento delle aree umide, il censimento degli anatidi selvatici, i dati stimati delle movimentazioni degli anatidi, la densità degli allevamenti intensivi di pollame domestico e infine la stima della prevalenza dell'IA. Sulla base delle indicazioni ottenute, sono stati identificate delle aree di rischio per la circolazione del virus all'interno delle quali sono stati individuati 12 capanni di caccia per il campionamento di tamponi cloacali da tutti gli anatidi cacciati. I capanni identificati sono stati riportati nella Figura 1a. I campionamenti sono stati eseguiti durante la stagione venatoria, a partire dalla seconda metà di settembre fino a fine gennaio di ciascun anno. I campioni raccolti nell'ambito di questa sorveglianza sono stati analizzati in singolo.

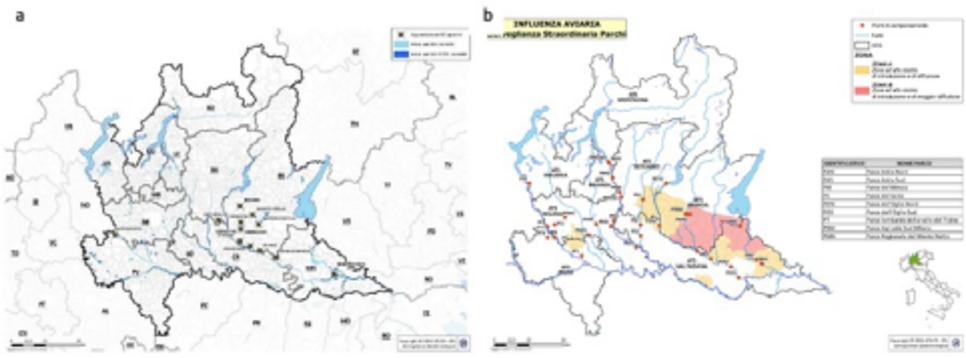
Sorveglianza passiva nei parchi: Sono stati scelti nove parchi regionali (Parco Adda Nord, Parco Adda Sud, Parco del Mincio, Parco del Serio, Parco dell'Oglio Nord, Parco dell'Oglio Sud, Parco Lombardo della Valle del Ticino, Parco Agricolo Sud Milano e Parco regionale del Monte Netto) (Figura 1b). Sono stati individuati tre punti campione all'interno di ogni parco avendo cura di identificare prioritariamente aree selezionate dagli anatidi per la riproduzione (es. laghetti, stagni fossi con acqua presente in modo continuativi, ecc.) e con maggior densità di allevamenti avicoli intensivi. I punti identificati sono stati georeferenzati. In ogni punto sono stati raccolti feci fino ad un massimo di 20 campioni per sito ogni 15 giorni. I campioni di feci sono stati analizzati in pool da 5.

Sorveglianza passiva su volatili selvatici trovati morti sul territorio. Da ogni volatile trovato morto e consegnato in IZSLER è stato raccolto un pool di organi (cervello, polmone e intestino) per l'analisi per IAV.

### *Ricerca del genoma IAV e sequenziamento del genoma completo*

Da tutti i campioni è stato estratto l'RNA virale tramite One-for-All Vet Kit (Indical Bioscience, Germania) utilizzando il QiaSymphony SP/AS (Qiagen, Germania) secondo il protocollo del produttore, con un volume di eluizione finale di 60 µL. La ricerca del genoma IAV è stata eseguita utilizzando una real time RT-PCR il cui target è il gene M come descritto in (Spackman et al., 2002). I campioni risultati positivi per IAV sono stati in seguito testati per ricerca genoma H5 e H7 tramite due real time RT-PCR (Spackman et al., 2002; Slomka et al., 2007). I campioni positivi per H5 o H7 sono stati inviati al Centro di Referenza per l'IA dell'IZSVE per la conferma della positività e la determinazione della patogenicità.

Inoltre, il sequenziamento del genoma completo di tutti i campioni positivi per IAV è stato eseguito come descritto in precedenza da Lycett et al. (2012) utilizzando il sistema SuperScript® III One-Step RT-PCR con Platinum® Taq High Fidelity (Thermo Fisher Scientific). I prodotti della RT-PCR sono stati purificati con NucleoSpin® Gel e PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Carlo Erba, Italia). Le librerie di DNA sono state realizzate con il kit NEX-TERA-XT (Illumina Inc. San Diego, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore. Le librerie in pool sono state sequenziate su uno strumento MiSeq (Illumina) utilizzando un Miseq Reagent nano Kit v2 in una corsa paired-end a 150 cicli. I dati sono stati assemblati de-novo con il CLC genomic workbench v.11 (Qiagen, Milano, Italia). Le sequenze dei geni sono state quindi allineate con ClustalW utilizzando MEGAX. Ai fini dell'assegnazione del sottotipo, gli alberi filogenetici dei geni HA e NA sono stati dedotti con il metodo della massima verosimiglianza (ML) implementato in IQ-TREE. La robustezza degli alberi ML è stata valutata staticamente mediante analisi bootstrap con 1.000 campioni bootstrap.



**Figura 1.** Punti di campionamento distribuiti nelle aree strategiche identificate tramite l'analisi di rischio per la circolazione di AIV a) Capanni di caccia; b) punti di campionamento nei parchi.

## RISULTATI

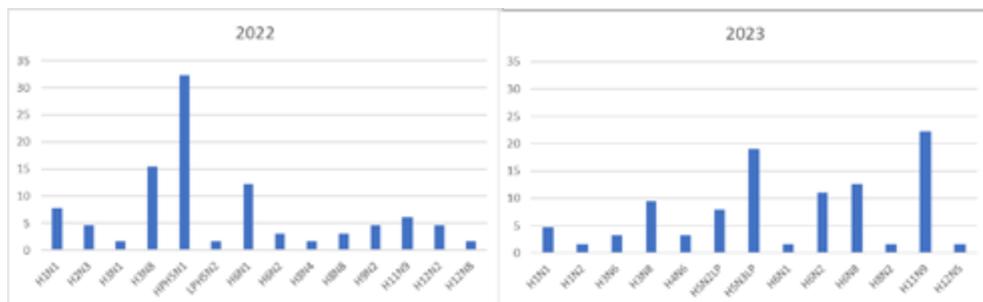
Sorveglianza attiva degli anatidi cacciati. Sono stati raccolti un totale di 3260 tamponi cloacali da anatidi cacciati, divisi in 1470 nel 2022-23 e 1790 nel 2023-24. Le due specie maggiormente campionate sono alzavola (61% nel 2022-23 e 65% nel 2023-24) e germano reale (23% nel 2022-23 e 21% nel 2023-24). Le altre specie di anatidi campionate sono codone, canapiglia, fischione, marzaiola, moretta, moriglione ma in una percentuale molto inferiore (complessivamente 16% nel 2022-23 e 14% nel 2023-24) (Figura 2).



**Figura 2.** Percentuali di anatidi cacciati e campionati nel corso dei due anni di interesse.

Lo screening di tutti i singoli tamponi cloacali ha rivelato un tasso di positività per AIV del 4,15% nel 2022-23 e del 5,47% nel 2023-24 per un totale di 159 campioni positivi. Il sequenziamento completo è stato possibile per 128 campioni ed ha evidenziato la presenza di 21 diversi sottotipi da H1N1 a H12N5 (Figura 3), ma nessun H7 durante il periodo di studio. Nei due anni sono state osservate situazioni epidemiologiche diverse. È interessante notare che il sottotipo H5N1 HPAIV, in particolare il clade 2.3.4.4b, è risultato il più frequente nella

stagione invernale 2022-23 (32,3%), ma completamente assente nella stagione 2023-24, nonostante fosse diffuso in gran parte dell'Europa. Al contrario, i ceppi H5 LPAIV, praticamente assenti nella prima stagione dello studio (1,5%), sono risultati i più frequenti nella seconda (27%). Tra gli altri sottotipi, H3N8, H6N1, H6N3, H6N8 e H11N9 sono stati i più frequentemente rilevati. Le specie con la maggiore varietà di sottotipi sono state l'alzavola e il germano reale, che sono state anche le specie più frequentemente campionate.

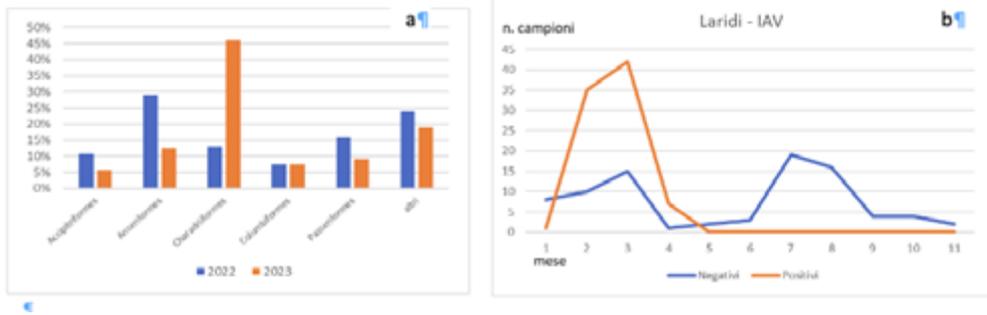


**Figura 3.** Percentuali dei diversi sottotipi identificati nelle due stagioni invernali (2022-23 e 2023-24) negli anatidi cacciati.

Sorveglianza passiva nei parchi: Sono stati conferiti complessivamente 1699 campioni di feci, rispettivamente 1200 nel 2022 e 499 nel 2023. I campioni sono stati analizzati in pool da massimo 5 campioni per un totale di 405 pool analizzati (281 pool nel 2022 e 124 nel 2023). Tutti i campioni sono stati analizzati per IAV con esito negativo.

Sorveglianza passiva su volatili selvatici trovati morti sul territorio regionale: Il numero di uccelli selvatici trovati e conferiti all'IZSLER ammonta a 481, in particolare 131 nel 2022 e 350 nel 2023. I volatili appartenevano a diversi ordini, tra questi i più rappresentativi erano i *Charadriiformes* (37%), *Anseriformes* (17%), *Passeriformes* (11%), *Accipitriformes* e *Columbiformes* (7%). Il restante 20% risultava composto da specie appartenenti ad altri 10 ordini caratterizzati da bassi numeri di volatili (Figura 4a).

L'indagine molecolare ha evidenziato 4 volatili positivi al virus H5N1 HPAIV del clade 2.3.4.4b: 2 poiane positive nel 2022 (14%, 2/14), un airone cenerino (5,5%, 1/18) e un gheppio nel 2023 (7,6%, 1/13). Per quanto riguarda l'ordine dei *Charadriiformes*, i gabbiani campionati sono risultati tutti negativi nel 2022 (17 esemplari) mentre 85 soggetti su 167 sono risultati positivi nel 2023, evidenziando una percentuale di positività complessiva del 51%. Tutte le positività sono state causate da un virus H5N1 HPAIV clade 2.3.4.4b appartenente al genotipo BB ampiamente presente in tutta Europa nel 2023 e caratterizzato da un'elevata patogenicità per i volatili della famiglia *Laridae*. Da sottolineare che queste positività sono state osservate tutte nei mesi da febbraio ad aprile in corrispondenza della prima ondata di casi positivi osservata nel 2023 in Europa in uccelli marini costieri (EFSA HPAI dashboard, 15-05-2024). Se consideriamo i campioni arrivati nel trimestre febbraio-aprile, la percentuale di positivi sale al 76% (Figura 4b).



**Figura 4.** a) percentuali di animali campionati, suddivisi per ordini; b) andamento delle positività nei laridi a partire dall'ondata di moria registrata dall'inizio del 2023.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati ottenuti dai tamponi cloacali degli anatidi cacciati mostrano una panoramica piuttosto complessa, con la circolazione di un numero elevato di sottotipi diversi, probabilmente derivanti da diverse introduzioni virali e da molteplici fenomeni di riassortimento tra anatidi migratori e volatili selvatici stanziali. L'analisi dei risultati ha evidenziato una situazione epidemiologica diversa tra le due stagioni invernali. Nella stagione invernale 2022-23, il sottotipo maggiormente identificato è stato l'H5N1 HPAIV, come rilevato in altri paesi europei. Questo virus, fin dalla sua prima identificazione, è sempre stato caratterizzato da una certa ciclicità, alternando periodi relativamente silenti nei mesi estivi a periodi di intensa circolazione. Tuttavia, negli ultimi anni la massiccia diffusione di questo virus negli uccelli marini costieri ha portato a segnalazioni di positività anche nel periodo primaverile ed estivo. I casi evidenziati nella stagione invernale 2022-23 nell'ambito della regione Lombardia potrebbero essere interpretati come la coda della grande ondata che ha avuto inizio nel 2020, e che ha interessato molte specie di uccelli selvatici e domestici, ma anche diverse specie di mammiferi, non solo a livello Europeo. L'elevata presenza del clade 2.3.4.4b, inoltre, pone particolare attenzione sull'eventuale rischio zoonotico veicolato da tali volatili, in prima battuta proprio per i cacciatori. Viceversa, è da sottolineare la totale assenza di tale virus nel corso della stagione invernale 2023-24 nonostante fosse documentata la sua circolazione in Europa nel medesimo periodo. Questi dati sono comunque in linea con la progressiva diminuzione di virus H5 HPAIV osservata nei volatili selvatici nei paesi europei dalla seconda metà del 2023 (EFSA, 2024). A partire da questo periodo invece i ceppi maggiormente rappresentati sono gli H5 LPAIV. Se la sorveglianza effettuata sugli animali cacciati (sorveglianza target attiva) permette di confermare il ruolo degli anatidi nel mantenimento e nella diffusione del virus, i dati raccolti tramite la sorveglianza passiva su animali trovati morti, suggeriscono un ruolo determinante degli uccelli appartenenti all'ordine dei *Charadriiformes*, in particolare dei laridi. Il quadro regionale lombardo rispecchia quindi la situazione osservata in tutta Europa negli ultimi anni (EFSA et al., 2023a; EFSA et al., 2023b). In particolare per quanto riguarda i gabbiani, fin dai primi mesi del 2023 si è verificata una moria di massa di questi volatili dovuta al ceppo H5N1, ed è possibile che tale ondata influenzale sia stata provocata dall'ingresso di animali migratori infetti provenienti dal nord Europa, avvenuto durante dicembre 2022. Studi filogenetici hanno evidenziato il coinvolgimento di un unico genotipo (BB), risultato da un riassortimento tra virus H5N1 HPAI e un sottotipo a bassa patogenicità (LPAI) particolarmente adattato ai gabbiani (H13) (EFSA et al., 2023a; EFSA et al., 2023b).

I dati forniti dal campionamento di feci all'interno dei parchi non hanno aggiunto ulteriori informazioni sui virus circolanti, nonostante i parchi selezionati fossero caratterizzati da ambienti idonei per la presenza delle specie serbatoio. È possibile ipotizzare che la matrice fecale, raccolta dal suolo, non rappresenti un campione ideale per la ricerca di virus influenzali ad alta patogenicità o che questi luoghi siano solo marginalmente frequentati da volatili selvatici provenienti da paesi infetti.

Focalizzando l'attenzione sulle specie considerate nella sorveglianza attiva, le prevalenze maggiori sono state registrate in germani reali e alzavole. Sicuramente queste sono specie di elezione, ma bisogna anche considerare che sono le specie campionate con maggiore frequenza. In particolare, la sorveglianza attiva negli anatidi cacciati si è rivelato un ottimo sistema di monitoraggio che ha consentito l'identificazione di virus influenzali circolanti sul territorio, permettendo di individuare non solo i ceppi ad alta patogenicità, ma anche una significativa presenza di virus a bassa patogenicità appartenenti a diversi sottotipi. La varietà dei sottotipi identificati dimostra, come già noto, quanto questi virus siano plastici e in grado di andare incontro a numerose mutazioni ed eventi di riassortimento. Sicuramente diversificare il "patrimonio genetico" rappresenta per tutti gli organismi una strategia di sopravvivenza vincente, e il fatto di aver identificato in specie molto comuni una tale varietà di ceppi è indice di buona adattabilità del virus non solo all'ospite, ma anche all'ambiente in cui questo vive. Di interesse è il fatto che non sia stato identificato nessun virus appartenente al sottotipo H7. Tale sottotipo è in grado di infettare un ampio range di specie tuttavia studi a lungo termine hanno confermato una bassa frequenza di identificazione dei sottotipi LPAIV H7 negli uccelli selvatici (De Marco et al., 2003; Latorre-Margalef et al., 2014; Naguib et al., 2019). Per quanto riguarda la sorveglianza passiva, la notevole circolazione del virus H5N1 HPAIV nei laridi in Nord Italia, in particolare nella Regione Lombardia, con conseguente elevata mortalità, è stata rilevata solo nei primi mesi del 2023, da febbraio ad aprile, con una percentuale di positività superiore al 70% seguita da una drastica riduzione dei casi nei mesi seguenti. Negli ultimi anni, inoltre, è stato osservato un aumento del numero di specie di uccelli selvatici coinvolti nell'epidemia di H5 il che potrebbe modificare il modello di diffusione del virus.

La sorveglianza attiva degli uccelli selvatici, soprattutto di quelli in grado di mantenere silenziosamente i virus HPAI in natura, come gli anatidi selvatici, risulta strategica per migliorare le conoscenze sui virus HPAI che circolano nelle popolazioni di uccelli selvatici. L'identificazione tempestiva dei virus HPAIV circolanti nel territorio nazionale o regionale ci consente l'applicazione di strategie di prevenzione da attuare principalmente nelle aree ad alta densità di pollame, per evitare casi di diffusione secondaria, così come misure per salvaguardare la salute pubblica. La generazione e la condivisione tempestiva dei dati relativi alle sequenze genomiche dei virus dell'influenza aviaria, non solo di quelli di alta patogenicità, sono di estrema importanza perché ci forniscono una visione completa dei sottotipi circolanti in un determinato territorio, ma soprattutto ci permettono di individuare tempestivamente l'emergere di virus con mutazioni associate a un maggiore potenziale zoonotico, resistenza ai farmaci antivirali o derive antigeniche.

**Finanziamenti:** Studio parzialmente finanziato dai progetti Next Generation EU-MUR PNRR Extended Partnership Initiative on Emerging Infectious Diseases (project no. PE00000007INF-ACT) e CCM SURVEID—Studio pilota per la sorveglianza di potenziali minacce da malattie infettive emergenti (EIDs) di origine virale mediante una piattaforma diagnostica basata sul Sequenziamento metagenomico di nuova generazione (mNGS), (project n. B93C22001210001).

## BIBLIOGRAFIA

- Burrough ER, Magstadt DR, Petersen B, et al. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b virus infection in domestic dairy cattle and cats, United States, 2024. *Emerg Infect Dis*. 2024 Jul. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid3007.240508>
- De Marco MA, Foni E, Campitelli L, et al. Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Vet Res Commun*. 2003;27(Suppl 1):107–14.
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EURL (European Reference Laboratory for Avian Influenza), et al. Scientific report: Avian influenza overview April–June 2023. *EFSA Journal*. 2023a;21(7):8191. Available from: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8191>
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EURL (European Union Reference Laboratory for Avian Influenza), et al. Scientific report: Avian influenza overview June–September 2023. *EFSA Journal*. 2023b;21(10):8328. Available from: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8328>
- EFSA HPAI dashboard. Highly pathogenic avian influenza virus detections in Europe. Available from: <http://hpai.efsa.europa.eu/>. Accessed 19-06-24.
- Global Avian Influenza Viruses with Zoonotic Potential situation update. Available from: <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/global-aiv-with-zoonotic-potential>. Updated 23-05-2024.
- Latorre-Margalef N, Tolf C, Grosbois V, et al. Long-term variation in influenza A virus prevalence and subtype diversity in migratory mallards in Northern Europe. *Proc Biol Sci*. 2014;281:20140098.
- Lycett SJ, Baillie G, Coulter E, et al. Estimating reassortment rates in co-circulating Eurasian swine influenza viruses. *J Gen Virol*. 2012;93:2326–2336.
- Naguib MM, Verhagen JH, Mostafa A, et al. Global patterns of avian influenza A (H7): virus evolution and zoonotic threats. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(6):608–621.
- Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J, et al. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis*. 2007;51:373–377.
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol*. 2002;40:3256–3260.

# VIROSI AVIARIE IN AVIFAUNA DECEDUTA PRESSO UN CENTRO RECUPERO ANIMALI SELVATICI DELLA LOMBARDIA: RISULTATI DEL MONITORAGGIO NELL'ANNO 2023

Rapi M.C.<sup>1</sup>, Musa L.<sup>1</sup>, Santandrea F.<sup>1</sup>, Lelli D.<sup>2</sup>, Moreno A.<sup>2</sup>, Lavazza A.<sup>2</sup>, Raimondi S.<sup>3</sup>, Farioli M.<sup>4</sup>, Chiari M.<sup>4</sup>, Bianchi G.B.M.<sup>1</sup>, Grilli G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Via dell'Università 6, 26900 Lodi, Italia;

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" (IZSLER), Via Antonio Bianchi 7/9, 25124 Brescia, Italia;

<sup>3</sup> Centro Recupero Fauna Selvatica, Via delle 3 Campane, Vanzago, MI, Italia;

<sup>4</sup> Unità Organizzativa Veterinaria, Regione Lombardia, Piazza Città di Lombardia 1, 20124 Milano, Italia

## Summary

Avian Influenza (AI), an infectious disease caused by *Orthomyxovirus* genus A, has increasingly captured the international community's attention due to its consequences. AI outbreaks in poultry lead to complete flock culling and breeding restrictions in neighboring areas, resulting in severe economic losses. Avian influenza also has a major impact on avifauna health: wild birds are also victims of the disease, which, when sustained by highly pathogenic viruses (HPAI), has significant implications for biodiversity. Moreover, some HPAI strains have been found to infect mammals and thus to have the potential to become pandemic threats, underscoring the need for collective vigilance and preventive measures.

Among the arboviruses of veterinary medical interest, West Nile Disease (WNV) is one of the most important emerging zoonoses. Transmitted by mosquitoes and maintained in the environment by wild birds, the virus could be responsible for severe neurological forms in birds and some animal species, including humans. Indeed, the Usutu virus (USUV) a flavivirus antigenically close related to WNV is also drawing increasing attention because of its zoonotic potential. While USUV has a severe impact on the blackbird population, the number of human cases remains low and very few cases of severe neurological disease have been described.

In this context, this work aimed to investigate throughout 2023 the presence of avian viruses in avifauna hospitalized and deceased at the Wildlife Rescue Center in Vanzago (Milano province, Lombardy region. North Italy). During the study, 811 wild birds belonging to 33 different species underwent virological investigation. Necropsy were performed at the Department of Veterinary Medicine and Animal Sciences - Lodi Branch, and the organs taken were those defined by national standards for detecting epidemic virosis in wild birds. Following collection, samples were delivered to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale - Virology Unit - of Lombardy and Emilia Romagna (BS), where the virological and molecular analyses were performed.

Of the 811 samples tested during 2023, 15 were positive for *Influenzavirus A*, subtype H5N1 HPAI, clade 2.3.4.4b. Of these, 13 specimens belonged to the species *Chroicocephalus ridibundus* (common gull), one to the species *Coturnix coturnix* (quail) and one to the species *Columba palumbus* (wood pigeon). Concerning the positives recorded for WNV and USUV, 29 specimens and 1 sample tested positive for the viruses

respectively. Eleven conditions of co-infection were also recorded (WNV + USUV). This research, which takes advantage from the national monitoring system implemented in the Lombardy Region, has provided vital information regarding the epidemiological trend of avian viral diseases in that area. These findings are not just informative, but also serve as a call to action, emphasizing the need for timely preventive measures to prevent the transmission of infections to other animal species, including mammals, and humans. Moreover, the results obtained in this study underline the need to reevaluate the role of species considered resistant to the disease, such as Columbiform, in the maintenance and circulation of *Influenzavirus A*.

## INTRODUZIONE

L'esigenza di comprendere sempre più a fondo l'ecologia e l'epidemiologia delle più importanti virosi aviari per la tutela della salute umana e animale, unita allo sviluppo di sistemi diagnostici caratterizzati da una sempre maggiore sensibilità, ha inaugurato una nuova era nella sorveglianza delle malattie infettive nella fauna selvatica.

Tra le malattie infettive oggetto di maggiore attenzione, l'Influenza Aviaria (AI) rappresenta una seria minaccia per gli avicoli di interesse zootecnico (Blagodatski et al., 2021; ENETWILD Consortium et al., 2024). L'agente eziologico, appartenente al genere *Influenzavirus A*, famiglia *Orthomyxoviridae* (Alexander, 2007) ha un ampio spettro d'ospite, ma è responsabile principalmente di infezioni nelle specie aviarie. I virus riconducibili a questo genere sono, tra gli Orthomyxovirus, i più importanti e i più diffusi, classificati in sottotipi sulla base delle proprietà antigeniche delle loro glicoproteine di superficie: l'emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA) (Alexander, 2007; Uyeki et al., 2022; Webster et al., 1992). Ad oggi sono riconosciuti 18 sottotipi di HA e 11 sottotipi di NA; di questi, 16 sottotipi di HA e 9 di NA sono mantenuti in ambiente, in tutte le combinazioni HxNx possibili (es. H5N1), dagli uccelli selvatici (Alexander, 2007; Fouchier et al., 2005; Olsen et al., 2006; Uyeki et al., 2022).

A seconda della gravità della sintomatologia osservabile nei volatili, i virus influenzali agenti della malattia (AIV) sono classificati in due gruppi: virus a bassa patogenicità (LPAI), determinanti infezioni prevalentemente asintomatiche che interessano il sistema respiratorio e digerente, e virus ad alta patogenicità (HPAI), responsabili di forme sistemiche letali (Blagodatski et al., 2021; França et al., 2014; Swayne et al., 2021; Yoon et al., 2014). Se le infezioni sostenute da ceppi HPAI sono raramente osservabili nell'avifauna, i virus LPAI sono invece stati isolati in almeno 105 specie di uccelli selvatici appartenenti a 26 famiglie diverse (Alexander, 2007; Olsen et al., 2006). Tra queste, le specie appartenenti all'Ordine degli *Anseriformes* (anatre, oche e cigni) e dei *Charadriiformes* (gabbiani, sterne e uccelli costieri), costituiscono gli ospiti *reservoir* degli *Influenzavirus A* LPAI (Artois et al., 2009; Krauss et al., 2010; Olsen et al., 2006; Yoon et al., 2014).

A fronte di ciò, questi animali, considerati anche i fenomeni migratori che li vedono protagonisti, sono riconosciuti quali principali responsabili della diffusione degli AIV a livello mondiale e come principale causa di trasmissione di tali virus agli avicoli di allevamento e a diverse specie di mammiferi (Artois et al., 2009; Blagodatski et al., 2021; Duan et al., 2023; Olsen et al., 2006). Considerando che il rilevamento del virus nel pollame comporta l'adozione di provvedimenti di polizia veterinaria (es. blocco dell'allevamento e abbattimento di tutti i capi allevati, limitazioni delle movimentazioni nell'area, etc.), con conseguente danno economico per le singole realtà produttive, a

livello nazionale ed Europeo è indispensabile garantire il monitoraggio della malattia (McLeod et al., 2016; Swayne, 2009). Pertanto, sebbene il ruolo degli uccelli selvatici nel mantenimento dei ceppi HPAI rimanga controverso, l'entità delle recenti epidemie, determinate dal sottotipo H5N1 HPAI, e l'individuazione di virus HPAI presentanti marcatori genetici di adattamento alla replicazione nei mammiferi hanno evidenziato la necessità di implementare un sistema di sorveglianza sistematico dell'avifauna (Alexander, 2007; Feare et al., 2006; Spackman, 2009).

Oltre all'Influenza Aviaria, altre virosi aviari per le quali il monitoraggio degli uccelli selvatici diviene strumento importante per la tutela della salute umana e animale sono la West Nile Disease (WND) e l'USUTU Disease. Considerate "zoonosi emergenti" in Europa e in Italia (dove sono oramai presenti in forma endemica da più di un decennio), queste arbovirosi sono causate da flavivirus neurotropi, ovvero il virus del Nilo occidentale (WNV) e il virus USUTU (USUV), mantenuti in ambiente grazie a un ciclo di trasmissione enzootico interessante gli uccelli selvatici, ospiti amplificatori e di mantenimento, e le zanzare del genere *Culex*, vettori dell'agente eziologico (Fros et al., 2015; Pfeiffer et al., 2010; Zannoli et al., 2019). Sebbene siano molte le specie di uccelli suscettibili a infezioni da WNV e USUV, i membri della famiglia *Passeriformes* (passeri domestici, corvidi e merli in particolare) vengono identificati quali ospiti aviari più importanti nell'epidemiologia di WND e USUTU in Europa e nelle Americhe (May et al., 2011; Roesch et al., 2019).

Gli esseri umani e altri mammiferi, quali gli equini, possono contrarre l'infezione a seguito della puntura di zanzare infette. Tali ospiti non raggiungono però livelli viremici tali da contribuire attivamente al mantenimento e alla circolazione dei virus considerati e, per tale motivo, sono definiti "*dead-end hosts*" (Dauphin et al., 2004; Roesch et al., 2019; Zannoli et al., 2019). Nonostante ciò, la WND rappresenta un pericolo concreto per la salute pubblica vista la capacità dell'agente eziologico di causare, in una minima percentuale di casi, forme neurologiche letali anche negli ospiti fondo cieco. Al contrario, USUV sembra presentare maggiore patogenicità e letalità per alcune specie di uccelli selvatici, ma raramente causa gravi patologie nell'uomo, determinando per lo più infezioni asintomatiche (Bowen et al., 2007; Nikolay, 2015; Zannoli et al., 2019). Tuttavia, sempre più prove evidenziano come il rischio per la salute pubblica legato alla circolazione territoriale di USUV sia da riconsiderare (Faggioni et al., 2018; Grotto et al., 2017). A fronte del fatto che non esistono terapie né vaccini efficaci per la cura e la profilassi di tali arbovirosi nell'uomo, diventa fondamentale la definizione di un attento sistema di monitoraggio (Saiz et al., 2017; Ulbert, 2019).

Viste queste premesse, e in considerazione di quanto previsto dal Piano Nazionale di Sorveglianza Influenza Aviaria e del Piano Nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi – PNA (2020-2025), il presente lavoro ha avuto come obiettivo la ricerca *post-mortem* di AIV, di WNV e di USUTV in tutte le specie di avifauna ricoverate presso un Centro Recupero Animali Selvatici (C.R.A.S.) della Lombardia.

## **MATERIALI E METODI**

### *Area di studio*

Lo studio è stato portato avanti per tutta la durata dell'anno 2023, sottoponendo a monitoraggio, e a successivo controllo virologico, n°811 uccelli selvatici appartenenti a differenti specie. Tutti i soggetti considerati sono stati selezionati, in relazione allo stato di conservazione delle carcasse, tra quelli deceduti spontaneamente o sottoposti ad

eutanasia presso il Centro Recupero Animali Selvatici (C.R.A.S.) - WWF di Vanzago (Provincia di Milano), struttura dedicata al ricovero e, quando possibile, al recupero di animali selvatici (mammiferi, uccelli e rettili) in difficoltà, provenienti principalmente dalle province di Milano, Varese, Como, Monza Brianza e Lodi.

### *Campionamento*

A seguito del decesso, tutti gli esemplari di avifauna, ritenuti validi per le successive indagini, sono stati immediatamente congelati a -20 °C per mezzo di congelatore appositamente predisposto e trasportati in sicurezza presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali dell'Università degli Studi di Milano. In questa sede è stata svolta un'accurata necropsia degli animali, finalizzata alla valutazione del quadro complessivo e all'identificazione di eventuali lesioni sospette in organi target, ma soprattutto al campionamento di questi stessi. Per ciascun esemplare indagato sono stati quindi campionati il cervello, la trachea, i polmoni, il cuore, la milza, i reni e l'ultimo tratto intestinale. Tutti i visceri campionati sono stati conservati in piastre di Petri sigillate, debitamente contrassegnate con specie e codice identificativo univoco dell'animale, attribuito al momento della sua accettazione presso il C.R.A.S., e infine congelate a -20 °C.

### *Analisi dei campioni – isolamento e caratterizzazione degli agenti virali*

Tutte le piastre sono state recapitate al Reparto di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di Brescia, dove la presenza di RNA virali (AIV, WNV, USUV) è stata indagata dai pool di organi campionati, dopo omogeneizzazione degli stessi, mediante analisi molecolari.

In particolare per l'identificazione dell'AIV è stato utilizzato il test della PCR real-time (PCR del gene codificante la sintesi della proteina M) (Spackman et al., 2002) per valutare, in primo luogo, la presenza o l'assenza di Influenzavirus tipo A nel pool tissutale analizzato; in caso di positività, è prevista la realizzazione di PCR real-time specifiche (PCR del gene codificante la sintesi della glicoproteina HA) finalizzata all'identificazione del sottotipo virale, con particolare interesse rivolto ai sottotipi H5 e H7 (Slomka et al., 2007; Slomka et al., 2009). I campioni risultati positivi per H5/H7 sono stati inviati all'EURL AI/ND, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), avente il compito di tipizzare e caratterizzare i ceppi isolati.

Per l'isolamento di West Nile virus e USUTU virus, la metodica diagnostica impiegata è stata la PCR-Real Time (Del Amo et al., 2013), così come previsto dal PNA, dal Regolamento delegato UE 2020/689 e dal *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal* – OIE. I campioni risultati positivi sono stati quindi inviati al Centro di Referenza Nazionale per le malattie esotiche (CESME) presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (Teramo) per la conferma e caratterizzazione del patogeno, con riferimento particolare al riconoscimento di WNV lineage 1 (L1) e WNV lineage 2 (L2).

Ogni campione è stato accompagnato in ogni suo spostamento, da e verso i laboratori di analisi, da una scheda identificata con la sigla W02, 'sorveglianza su uccelli stanziali appartenenti a specie sinantropiche - sorveglianza sulla mortalità negli uccelli selvatici', predisposta per l'accompagnamento di campioni prelevati nell'ambito delle attività di sorveglianza della West Nile disease.

## RISULTATI

Nel periodo di studio considerato, da Gennaio 2023 a Dicembre 2023, sono stati oggetto di monitoraggio per la ricerca di *Influenzavirus A*, WNV e USUV n°811 esemplari di avifauna appartenenti a 17 Ordini tassonomici e a 67 specie, deceduti presso il C.R.A.S. di Vanzago (MI) (Tabella 1).

ORDINE	NOME COMUNE	SPECIE	FAMIGLIA	NUMERO
<i>Accipitriformes</i>	Astore	<i>Accipiter gentilis</i>	<i>Accipitridae</i>	7
	Poiana	<i>Buteo buteo</i>	<i>Accipitridae</i>	4
	Sparviero	<i>Accipiter nisus</i>	<i>Accipitridae</i>	3
<i>Anseriformes</i>	Germano reale	<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Anatidae</i>	67
	Moretta	<i>Aythya fuligula</i>	<i>Anatidae</i>	1
<i>Apodiformes</i>	Rondone alpino	<i>Tachymarptis melba</i>	<i>Apodidae</i>	9
	Rondone comune	<i>Apus apus</i>	<i>Apodidae</i>	54
<i>Caprimulgiformes</i>	Succiacapre	<i>Caprimulgus europaeus</i>	<i>Caprimulgidae</i>	1
<i>Charadriiformes</i>	Beccaccia	<i>Scolopax rusticola</i>	<i>Scolopacidae</i>	4
	Gabbiano comune	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	<i>Laridae</i>	17
	Gabbiano reale	<i>Larus michahellis</i>	<i>Laridae</i>	6
	Pavoncella	<i>Vanellus vanellus</i>	<i>Charadriidae</i>	1
<i>Ciconiiformes</i>	Airone cenerino	<i>Ardea cinerea</i>	<i>Ardeidae</i>	8
	Airone guardabuoi	<i>Babulcus ibis</i>	<i>Ardeidae</i>	3
	Cicogna bianca	<i>Ciconia ciconia</i>	<i>Ciconiidae</i>	1
<i>Columbiformes</i>	Colombaccio	<i>Columba palumbus</i>	<i>Columbidae</i>	69
	Tortora dal collare orientale	<i>Streptopelia decaocto</i>	<i>Columbidae</i>	49
<i>Coraciiformes</i>	Martin pescatore	<i>Alcedo atthis</i>	<i>Alcedininae</i>	2
	Upupa	<i>Upupa epops</i>	<i>Upupidae</i>	2
<i>Falconiformes</i>	Falco pellegrino	<i>Falco peregrinus</i>	<i>Falconidae</i>	1
	Gheppio	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Falconidae</i>	25
	Lodolaio	<i>Falco subbuteo</i>	<i>Falconidae</i>	1
<i>Galliformes</i>	Fagiano	<i>Phasianus colchicus</i>	<i>Phasianidae</i>	2
	Pernice rossa	<i>Alectoris rufa</i>	<i>Phasianidae</i>	1
	Quaglia	<i>Coturnix coturnix</i>	<i>Phasianidae</i>	1
<i>Gruiformes</i>	Folaga	<i>Fulica atra</i>	<i>Rallidae</i>	1
	Gallinella d'acqua	<i>Gallinula chloropus</i>	<i>Rallidae</i>	2
<i>Passeriformes</i>	Balestruccio	<i>Delichon urbicum</i>	<i>Hirundinidae</i>	6
	Balia nera	<i>Ficedula hypoleuca</i>	<i>Muscicapidae</i>	2
	Ballerina bianca	<i>Motacilla alba</i>	<i>Motacillidae</i>	2
	Capinera	<i>Sylvia atricapilla</i>	<i>Sylviidae</i>	9
	Cardellino	<i>Carduelis carduelis</i>	<i>Fringillidae</i>	6
	Cincia mora	<i>Periparus ater</i>	<i>Paridae</i>	1
	Cinciallegra	<i>Parus major</i>	<i>Paridae</i>	20

	Codibugnolo	<i>Aegithalos caudatus</i>	<i>Aegithalidae</i>	4
	Codirosso comune	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	<i>Muscicapidae</i>	2
	Codirosso spazzacamino	<i>Phoenicurus ochruros</i>	<i>Muscicapidae</i>	3
	Cornacchia grigia	<i>Corvus corone cornix</i>	<i>Corvidae</i>	72
	Cuculo	<i>Cuculus canorus</i>	<i>cuculidae</i>	3
	Fiorrancino	<i>Regulus ignicapilla</i>	<i>Regulidae</i>	1
	Fringuello	<i>Fringilla coelebs</i>	<i>Fringillidae</i>	10
	Gazza	<i>Pica pica</i>	<i>Corvidae</i>	49
	Ghiandaia	<i>Garrulus glandarius</i>	<i>Corvidae</i>	3
	Lui' piccolo	<i>Phylloscopus collybita</i>	<i>Sylviidae</i>	1
	Merlo	<i>Turdus merola</i>	<i>Turdidae</i>	130
	Passera d'italia	<i>Passer italiae</i>	<i>Passeridae</i>	4
	Passera mattugia	<i>Passer montanus</i>	<i>Passeridae</i>	1
	Pettirosso	<i>Erithacus rubecula</i>	<i>Muscicapidae</i>	20
	Regolo	<i>Regulus regulus</i>	<i>Regulidae</i>	9
	Rondine	<i>Hirundo rustica</i>	<i>Hirundinidae</i>	10
	Rondine montana	<i>Ptyonoprogne rupestris</i>	<i>Hirundinidae</i>	1
	Storno	<i>Sturnus vulgaris</i>	<i>Sturnidae</i>	18
	Tordo bottaccio	<i>Turdus philomelos</i>	<i>Turdidae</i>	2
	Verdone	<i>Chloris chloris</i>	<i>Fringillidae</i>	2
	Verzellino	<i>Serinus serinus</i>	<i>Fringillidae</i>	5
<i>Pelecaniformes</i>	Cormorano	<i>Phalacrocorax carbo</i>	<i>Phalacrocoraci- dae</i>	1
	Garzetta	<i>Egretta garzetta</i>	<i>Ardeidae</i>	2
	Ibis sacro	<i>Threskiornis aethiopicus</i>	<i>Threskiornithidae</i>	3
<i>Piciformes</i>	Picchio nero	<i>Dryocopus martius</i>	<i>Picidae</i>	1
	Picchio rosso maggiore	<i>Dendrocopos major</i>	<i>Picidae</i>	13
	Picchio verde	<i>Picus viridis</i>	<i>Picidae</i>	26
<i>Podicipediformes</i>	Swasso maggiore	<i>Podiceps cristatus</i>	<i>Podicipedidae</i>	1
<i>Strigiformes</i>	Allocco	<i>Strix aluco</i>	<i>Strigidae</i>	3
	Assiolo	<i>Otus scops</i>	<i>Strigidae</i>	5
	Barbagianni	<i>Tyto alba</i>	<i>Strigidae</i>	1
	Civetta	<i>Athene noctua</i>	<i>Strigidae</i>	16
	Gufo comune	<i>Asio otus</i>	<i>Strigidae</i>	1
<i>TOTALE</i>				<i>811</i>

**Tabella 1.** Esemplari di avifauna monitorati e sottoposti ad indagine virologica. Per ogni animale viene indicato l'ordine tassonomico, il nome comune, la specie e la famiglia di appartenenza. Viene altresì riportato il numero di soggetti campionati della stessa specie.

In relazioni agli Ordini di appartenenza degli esemplari, nel campione considerato la maggior parte degli uccelli apparteneva agli Ordini *Passeriformes* (n°396 animali), *Columbiformes* (n°118 animali), *Anseriformes* (n°68 animali) e *Apodiformes* (n°63 esemplari). Gli esemplari campionati appartenenti a tali Ordini rappresentano circa il 79% di tutti i soggetti monitorati nello studio. Meno rappresentati sono, tra gli altri, gli Ordini *Caprimulgiformes*, *Podicipediformes* e *Gruiiformes*. Considerando le famiglie di appartenenza, la maggior parte dei soggetti indagati apparteneva alla famiglia *Turdidae* (n°132 esemplari), *Corvidae* (n°124 esemplari), *Columbidae* (n°118 esemplari) e *Anatidae* (n°68 esemplari). Per le famiglie *Caprimulgidae*, *Ciconiidae*, *Phalacrocoracidae*, *Podicipedidae* e *Charadriidae* contiamo un solo esemplare analizzato nel periodo considerato.

Gli uccelli ricoverati presso il C.R.A.S di Vanzago e utilizzati successivamente nell'ambito della sorveglianza per le virosi di interesse, provenivano dalle province di Milano (532/811, 66%), Varese (105/811, 13%), Monza Brianza (89/811, 11%), Como (52/811, 7%), Lodi (18/811, 2,2%), Bergamo (6/811, 0,7%), Verbano-Cusio-Ossola (2/811), Pavia (2/811), Novara (2/811), Cremona (1/811), Brescia (1/811) e Macerata (1/811).

Con riferimento all'Influenza Aviaria, degli 811 pool di organi testati con metodica Real Time PCR, 15 sono risultati positivi a *Influenzavirus A*. Di questi, 13 esemplari appartenevano alla specie *Chroicocephalus ridibundus* (gabbiano comune), uno alla specie *Coturnix coturnix* (quaglia) e uno alla specie *Columba palumbus* (colombaccio). Le positività nei suddetti esemplari sono state registrate nei mesi di febbraio 2023 e Marzo 2023 (Tabella 2).

DATA PRELIEVO	SPECIE POSITIVE	VIRUS	FAMIGLIA	ORDINE	PROVINCIA DI RITROVAMENTO
feb-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
feb-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Columba palumbus</i> (colombaccio)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Columbidae</i>	<i>Columbiformes</i>	VA
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI

mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MB
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (gabbiano comune)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Laridae</i>	<i>Charadriiformes</i>	MI
mar-23	<i>Coturnix coturnix</i> (quaglia)	H5N1 HPAI clade 2.3.4.4b	<i>Phasianidae</i>	<i>Galliformes</i>	MB

**Tabella 2.** Positività registrate per Influenzavirus A. In tabella vengono riportati: la data di campionamento dell'animale (mese-anno), la specie di appartenenza dello stesso, il virus per il quale la positività è stata riconosciuta, la famiglia e l'ordine tassonomico, il luogo di ritrovamento dell'esemplare portato al C.R.A.S. e li deceduto.

Considerando il numero totale di soggetti campionati nel periodo di sorveglianza e, tra questi, il numero complessivo di esemplari per i quali le metodiche diagnostiche hanno accertato la positività per l'*Influenzavirus* tipo A, la prevalenza della malattia, nel campione indagato, è risultata essere dell'1,85% (15/811).

Valutando la prevalenza di AI dividendo i soggetti positivi per Ordine tassonomico, la maggior parte di questi faceva parte dell'Ordine *Charadriiformes* (gabbiano comune). Considerando che su un totale di 28 soggetti appartenenti a tale Ordine esaminati nel 2023, 13 sono risultati positivi, la prevalenza di AIV nel sotto campione considerato è risultata del 46%. Per quanto concerne gli esemplari appartenenti all'Ordine *Columbiformes*, su 118 soggetti esaminati nel periodo considerato un solo animale è risultato positivo, con quindi prevalenza del virus dello 0,85%. La positività nei confronti dell'*influenzavirus* A è stata riconosciuta anche in un soggetto dell'ordine *Galliformes* (quaglia), ma dato il numero totale esiguo di Galliformi campionati nel 2023 (n° totale animali esaminati: 4), lo studio della prevalenza risulta poco indicativo.

Con riferimento a West Nile disease e USUTU, degli 811 campioni sottoposti a indagine virologica tramite metodica Real Time PCR, 29 sono risultati positivi. In particolare, 16 soggetti sono risultati positivi per WNV-L2, uno per WNV-L1, uno per USUV, e 11 sono stati i casi di co-infezione (WNV-L2 + USUV). Tutti i casi sono stati registrati nei mesi di Luglio 2023, Agosto 2023 e Settembre 2023 (Tabella 3).

DATA PRELIEVO	SPECIE POSITIVE	VIRUS	FAMIGLIA	ORDINE	PROVINCIA DI RITROVAMENTO
lug-23	Astore ( <i>Accipiter gentilis</i> )	WNV-L2	Accipitridae	Accipitriformes	CO
lug-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2	Corvidae	Passeriformes	MI
lug-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2 + USUV	Corvidae	Passeriformes	MI
lug-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2 + USUV	Corvidae	Passeriformes	MI
lug-23	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	WNV-L2 + USUV	Corvidae	Passeriformes	MI
lug-23	Merlo ( <i>Turdus merola</i> )	WNV- L2 + USUV	Turdidae	Passeriformes	VA
lug-23	Poiana ( <i>Buteo buteo</i> )	WNV- L2 + USUV	Accipitridae	Accipitriformes	VA
ago-23	Astore ( <i>Accipiter gentilis</i> )	WNV-L2	Accipitridae	Accipitriformes	MI
ago-23	Astore ( <i>Accipiter gentilis</i> )	WNV-L2	Accipitridae	Accipitriformes	CO
ago-23	Cardellino ( <i>Carduelis carduelis</i> )	WNV-L2	Fringillidae	Passeriformes	MI
ago-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2 + USUV	Corvidae	Passeriformes	MI
ago-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV- L2	Corvidae	Passeriformes	MI
ago-23	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	WNV-L2	Corvidae	Passeriformes	MI
ago-23	Gheppio ( <i>Falco tinnunculus</i> )	WNV-L2	Falconidae	Falconiformes	VA
ago-23	Gheppio ( <i>Falco tinnunculus</i> )	WNV-L1	Falconidae	Falconiformes	VA
ago-23	Gheppio ( <i>Falco tinnunculus</i> )	WNV-L2 + USUV	Falconidae	Falconiformes	CO
ago-23	Merlo ( <i>Turdus merola</i> )	USUV	Turdidae	Passeriformes	MB
ago-23	Merlo ( <i>Turdus merola</i> )	WNV- L2 + USUV	Turdidae	Passeriformes	MI
ago-23	Merlo ( <i>Turdus merola</i> )	WNV-L2 + USUV	Turdidae	Passeriformes	MI
ago-23	Rondone alpino ( <i>Tachymarptis melba</i> )	WNV-L2 + USUV	Apodidae	Apodiformes	CO

set-23	Astore ( <i>Accipiter gentilis</i> )	WNV-L2	<i>Accipitridae</i>	<i>Accipitriformes</i>	CO
set-23	Colombaccio ( <i>Columba palumbus</i> )	WNV-L2 + USUV	<i>Columbidae</i>	<i>Columbiformes</i>	MI
set-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2	<i>Corvidae</i>	<i>Passeriformes</i>	VA
set-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2	<i>Corvidae</i>	<i>Passeriformes</i>	VA
set-23	Cornacchia grigia ( <i>Corvus corone cornix</i> )	WNV-L2	<i>Corvidae</i>	<i>Passeriformes</i>	VA
set-23	Gazza ( <i>Pica pica</i> )	WNV-L2	<i>Corvidae</i>	<i>Passeriformes</i>	VA
set-23	Gheppio ( <i>Falco tinnunculus</i> )	WNV-L2	<i>Falconidae</i>	<i>Falconiformes</i>	MI
set-23	Gheppio ( <i>Falco tinnunculus</i> )	WNV-L2	<i>Falconidae</i>	<i>Falconiformes</i>	MI
set-23	Rondone alpino ( <i>Tachymarptis melba</i> )	WNV-L2	<i>Apodidae</i>	<i>Apodiformes</i>	MI

**Tabella 3.** Animali risultati positivi alla ricerca di WNV e USUV. Vengono riportati per ciascun soggetto: la data di campionamento (mese-anno), la specie, il virus per il quale la positività è stata riconosciuta, l'ordine tassonomico, la famiglia di appartenenza e il comune di ritrovamento dell'esemplare con relativa provincia.

Considerando il numero totale di soggetti campionati nel periodo di sorveglianza, nonché il numero di soggetti risultati positivi per uno dei due virus, WNV (L1 e L2) o USUV, la prevalenza di WNV nel campione è risultata essere del 2,1% (17/811), mentre quella di USUV dello 0,1% (1/811). Per quanto riguarda la co-infezione, la prevalenza stimata di tale condizione nel campione è dell'1,4% (11/811).

In riferimento solo a WNV, considerando sia il *lineage* 1 che il *lineage* 2, l'Ordine *Passeriformes* presenta il più alto numero di positività (8/17), seguito dall'Ordine *Accipitriformes* (4/17), *Falconiformes* (4/17) e *Apodiformes* (1/17). Volendo valutare la prevalenza di WNV negli Ordini citati, quello degli *Accipitriformes* mostra la prevalenza più alta (28,6%), con 4 animali positivi su un totale di 14 soggetti campionati nel 2023. In tale Ordine, la famiglia più rappresentata, considerando le positività registrate, è la famiglia *Corvidae*. Nei *Falconiformes* la prevalenza di WNV è risultata essere del 14,8% (4 soggetti positivi su 27 campionati); seguono l'Ordine *Passeriformes*, con una prevalenza del 2% (8/398) e l'Ordine *Apodiformes*, con una prevalenza dell'1,58% (1/63). Nel dettaglio, sul totale delle positività registrate per WNV, la Real Time RT-PCR ha permesso di identificare il genoma del *lineage* 1 in un solo esemplare di *Falco tinnunculus* nel mese di Agosto 2023. Tutte gli altri casi di positività hanno interessato WNV *lineage* 2.

Per quanto concerne USUV, a fronte dell'unico registrato in un esemplare di *Turdus merola* (merlo), la prevalenza del virus nell'Ordine *Passeriformes* è risultata essere dello 0,25% (1/396).

In riferimento ai casi di co-infezione, considerando gli Ordini di appartenenza degli esemplari campionati, i Passeriformi presentano il numero più alto di positività (7/11), con 3 di queste accertate in esemplari di *Turdus merola* (famiglia *Turdidae*), una riconosciuta in un esemplare di *Pica pica* (famiglia *Corvidae*) e 3 in esemplari di *Corvus corone cornix* (famiglia *Corvidae*). La prevalenza dei casi di infezione contemporanea da WNV-L2 e USUV nell'Ordine considerato risulta quindi essere dell'1,76% (7 esemplari positivi su 396 campionati). Altri casi di co-infezione sono stati registrati in un esemplare di *Accipiter gentilis*, Ordine *Accipitriformes* (1/11), in un esemplare di *Falco tinnunculus*, Ordine *Falconiformes* (1/11), in un esemplare di *Columba palumbus*, Ordine *Columbiformes* (1/11) e in un esemplare di *Tachymarpis melba*, Ordine *Apodiformes* (1/11). In tali Ordini la prevalenza della co-infezione risulta quindi essere, rispettivamente, del 7% (1 esemplare positivo su 14 campionati), del 3,7% (1/27), dello 0,8% (1/118) e dell'1,6% (1/63).

## DISCUSSIONE

Il presente studio evidenzia come, durante l'anno 2023, nelle popolazioni di uccelli a vita libera presenti nell'areale interessato dall'indagine epidemiologica circolassero *Influenzavirus A*, West Nile virus e USUTU virus.

Per quanto concerne l'Influenza Aviaria, nel periodo considerato la prevalenza della malattia nel campione indagato è risultata essere dell'1,85% (15/811). Sebbene questa percentuale possa sembrare ininfluenza, va sottolineato che il monitoraggio dell'avifauna viene eseguito da oltre sei anni presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali dell'Università degli Studi di Milano, in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna e con il contributo del C.R.A.S. di Vanzago, e nessuna positività a virus influenzali A era mai stata riscontrata.

Le 15 positività registrate nei mesi di febbraio e marzo sono state tutte ricondotte al sottotipo H5N1 HPAI, clade 2.3.4.4b. Sul totale appena definito, 13 riguardavano esemplari della specie *Chroicocephalus ridibundus* provenienti dalle Province di Milano, Varese e Monza Brianza. Questi dati risultano essere in linea con quanto indicato nelle altre segnalazioni italiane ed europee, riportanti un numero importante di focolai sostenuti dal sottotipo A H5N1 HPAI, clade 2.3.4.4b, negli uccelli marini (EFSA, 2023; EFSA et al., 2023b; EFSA et al., 2023c). In considerazione del fatto che il numero di gabbiani presenti nel nostro Paese è particolarmente consistente, soprattutto nelle zone umide (es. lago di Garda, delta del Po, etc.) (Brambilla et al., 2023; Zenatello et al., 2021), in alcune delle quali la densità degli allevamenti avicoli risulta essere elevata, il rischio di trasmissione dell'*influenzavirus A* alle specie avicole di interesse produttivo non è trascurabile. Tale considerazione risulta particolarmente pertinente se fatta con riferimento alla situazione osservabile nei mesi primaverili quando, negli stormi, è possibile ritrovare anche animali giovani, importanti eliminatori del patogeno (EFSA et al., 2023c).

Considerando il ruolo degli uccelli selvatici nella determinazione di focolai di influenza aviaria HPAI negli allevamenti avicoli, risulta evidente l'importanza, nell'attuare piani di sorveglianza integrata, della collaborazione tra diversi partner, tra i quali un ruolo chiave è svolto dai Centri di recupero della fauna selvatica. Tali strutture, infatti, non hanno solo un ruolo nella salvaguardia della fauna autoctona, ma rappresentano anche un osservatorio epidemiologico importante per il monitoraggio sanitario dell'a-

vifauna. Il coinvolgimento nella presente indagine sperimentale di un C.R.A.S. per il campionamento di uccelli selvatici ha reso possibile lo studio di specie altrimenti difficilmente accessibili, quali i rapaci, e ha permesso di estendere l'indagine epidemiologica a specie non ancora inserite nell'elenco ufficiale europeo valido al 2023 (EFSA et al., 2017).

In riferimento a ciò, fino al recente aggiornamento (Reinartz et al., 2024), all'interno dei confini della UE erano cinquanta le specie di uccelli selvatici comunemente oggetto di sorveglianza per i virus H5 HPAI. L'elenco delle stesse, in ampliamento, costituisce una guida per gli operatori, permettendo agli stessi di valutare su quali specie di avifauna concentrare maggiormente (sebbene non esclusivamente) l'attenzione al fine di costruire un sistema di allerta precoce per l'influenza aviaria (EFSA et al., 2017; Reinartz et al., 2024). Considerando i dati sperimentali raccolti nel presente lavoro, delle 67 specie monitorate nel 2023 solo 9 erano presenti nell'elenco europeo in vigore nel suddetto anno (EFSA et al., 2017). Ad eccezione quindi degli esemplari appartenenti alle specie *Anas platyrhynchos*, *Egretta garzetta*, *Ardea cinerea*, *Phalacrocorax carbo*, *Buteo buteo*, *Accipiter gentilis*, *Chroicocephalus ridibundus*, *Pica pica*, *Ciconia ciconia* e *Falco peregrinus*, per tutte le altre specie non sarebbe stato possibile effettuare un'indagine virologica senza la collaborazione del C.R.A.S.

Positività al virus influenzale A H5N1 HPAI sono state riconosciute anche in un esemplare di quaglia (*Coturnix coturnix*) e di colombaccio (*Columba palumbus*). Nonostante dall'analisi della prevalenza della malattia negli ordini *Columbiformes* e *Galliformes* non emergano dati particolarmente significativi, l'accertamento dell'infezione in queste due specie risulta interessante, in particolar modo in riferimento al colombaccio. Se infatti studi scientifici riconoscono nella quaglia europea (*Coturnix coturnix*) una specie suscettibile ai virus influenzali A (Bertran et al., 2013; Sun et al., 2011; Webster Robert et al., 2002), nella letteratura risulta invece difficile trovare informazioni relative al ruolo dei columbidi nel ciclo di trasmissione e di mantenimento dell'agente virale. I casi di infezione naturale degli esemplari a vita libera sono stati infatti raramente documentati e, oltre a ciò, anche a fronte di infezioni sperimentali in laboratorio gli animali appartenenti a quest'ordine hanno dimostrato una bassa sensibilità nei confronti dei virus influenzali aviari (Abolnik, 2014; Cardona et al., 2009; Leight Perkins et al., 2002). Malgrado le sporadiche segnalazioni, i Columbiformi sono stati inseriti nella lista europea delle specie da preferire per la sorveglianza efficace di AI aggiornata al 2024 (Reinartz et al., 2024).

In riferimento a West Nile disease e USUTU disease, la maggior parte delle positività registrate nel presente studio hanno interessato WNV, con 1 solo caso di infezione da USUV documentato.

Il virus della West Nile è uno dei flavivirus trasmessi da zanzare più diffusi al mondo, attualmente diffuso in Africa, Asia occidentale, Europa, Australia e America (Dauphin et al., 2004; Weissenböck et al., 2010). Isolato per la prima volta in Uganda nel 1937, nell'agosto del 1999 è stato identificato negli Stati Uniti dove, nell'area di New York City, ha causato moria in stormi di corvi americani (*Corvus brachyrhynchos*), nonché forme neurologiche in cavalli e persone (Komar et al., 2001). In Europa il WNV è attualmente endemico nell'Europa centrale e sud-orientale (Weissenböck et al., 2010), con ceppi circolanti appartenenti ai *lineage* 1 e 2, riconosciuti quali responsabili delle più gravi epidemie nell'uomo (Zannoli et al., 2019). In Italia, a partire dal 2014 si è assistito ad un progressivo aumento della circolazione del virus, fino ad arrivare al 2018,

anno eccezionale in termini di numero di casi di infezione e malattia nell'uomo, negli equidi e nelle specie *reservoir* (ECDC, 2019; Trogu et al., 2021).

La meno nota USUTU disease è stata osservata per la prima volta in Europa nel 2001, causando una significativa mortalità tra le popolazioni di uccelli in Austria (Weissenböck et al., 2002), sebbene probabilmente il virus fosse presente in Europa dal 1996 o prima. Successivamente, l'USUV si è diffuso in tutta Europa, causando mortalità nell'avifauna e, sebbene raramente, alcuni casi neurologici negli esseri umani (Clé et al., 2019; Saiz et al., 2017).

In riferimento agli ospiti serbatoio di entrambi gli arbovirus indagati, diversi studi scientifici riconoscono negli Ordini *Passeriformes* (specialmente le famiglie *Corvidae*, *Fringillidae* e *Passeridae*), *Charadriiformes* (famiglia *Laridae*), *Accipitriformes*, *Falconiformes* e *Strigiformes* quelli comprendenti le specie maggiormente sensibili a WNV e USUV (Jourdain et al., 2007a; McLean et al., 2002; Pérez-Ramírez et al., 2014). Nel presente studio, le 17 positività registrate per WNV hanno interessato esemplari di cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*), gazza (*Pica pica*), cardellino (*Carduelis carduelis*), astore (*Accipiter gentilis*), gheppio (*Falco tinnunculus*) e merlo (*Turdus merola*), specie quest'ultima particolarmente sensibile anche ad USUV (Clé et al., 2019) e nella quale è stato riconosciuto l'unico caso di positività per tale virus.

Per quanto tutte le specie elencate siano riconosciute come particolarmente sensibili a WNV, con nota particolare alla famiglia dei Corvidi, l'elevato numero di casi in animali spazzini e con comportamento predatorio risulta interessante. Infatti, sebbene il ciclo di trasmissione primario di WNV e USUV rimanga quello “zanzara (*Culex* spp.) – uccello – zanzara (*Culex* spp.)”, alcuni studi hanno dimostrato come alcune specie di avifauna possano contrarre l'infezione anche a fronte dell'ingestione di animali viremici, morti o predati (Komar et al., 2003; Pérez-Ramírez et al., 2014). A fronte di questa considerazione, siccome i livelli di viremia negli uccelli non variano in dipendenza delle due modalità di infezione (Komar et al., 2003), e siccome il presente studio non ha visto l'utilizzo di una q-PCR, tale aspetto non può però essere approfondito ulteriormente.

Anche il dato relativo al fatto che 15 delle positività per WNV su 17 totali sono state riconosciute in esemplari di merlo comune (*Turdus merola*), gazza (*Pica pica*) e cornacchia grigia (*Corvus corone cornix*) risulta conforme a quanto riportato in letteratura. La preferenza alimentare delle zanzare del genere *Culex*, vettori primari del patogeno, per il merlo comune è infatti documentata e la diminuzione del numero di merli nel territorio, risultato della migrazione o dell'eccessiva antropizzazione dell'areale considerato, è associata all'aumento dell'assunzione del pasto di sangue sui corvidi (Rizzoli et al., 2015). Tali specie hanno quindi un ruolo chiave nell'epidemiologia del WNV in Europa, a differenza delle altre specie riconosciute positive per WNV nel presente studio, raramente implicate in focolai della malattia. Questa considerazione risulta particolarmente pertinente se fatta con riferimento all'esemplare di colombaccio (*Columba palumbus*): le specie appartenenti all'ordine *Columbiformes*, così come quelle riconducibili all'ordine *Pelecaniformes*, *Psittaciformes* e *Galliformes*, a differenza dei passeriformi non sviluppano infatti livelli viremici tali da garantire la trasmissione dell'agente eziologico e la conseguente circolazione della malattia in ambiente (Pérez-Ramírez et al., 2014).

Interessanti sono anche le positività per WNV documentate negli esemplari di rondone alpino (*Tachymartus melba*), specie riconosciuta come potenzialmente coinvolta

nell'introduzione, amplificazione e diffusione del patogeno dall'Africa meridionale in Europa (Jourdain et al., 2007b).

In relazione a quanto finora discusso, risulta evidente come WNV e USUV presentino una sovrapposizione geografica, risultando co-circolanti in Europa, e condividano, nel loro ciclo di trasmissione, ospiti vettori (zanzare del genere *Culex*) e alcuni degli ospiti *reservoir*. In relazione al fatto che anche gli areali dei due arbovirus sono parzialmente sovrapponibili, casi di co-infezione in specie suscettibili sono già stati segnalati, sebbene non così frequentemente in funzione del fatto che per WNV e USUV vi è cross-reattività anticorpale (Aberle et al., 2018; Körsten et al., 2023; Nikolay, 2015; Santos et al., 2022; Zannoli et al., 2019). Considerando ciò, i risultati del presente studio risultano significativi: visti i numericamente ridotti casi di co-infezione registrati ad oggi anche nell'avifauna, il ritrovamento di 11 animali positivi a WNV-L2 e USUV contemporaneamente nei soli mesi di Luglio-Settembre 2023 pone in luce la necessità di realizzare studi più approfonditi sul tema. Infatti, le co-infezioni possono presentare, sia negli uccelli che negli esseri umani, un esito differente rispetto a quello delle mono-infezioni, avendo dunque un diverso peso in termini di tutela della salute pubblica (Santos et al., 2022; Zannoli et al., 2019).

## CONCLUSIONI

L'osservazione di focolai di Influenza Aviaria negli uccelli selvatici e nelle specie avicole non è più un fenomeno raro. Negli ultimi 15 anni focolai in specie aviarie sono stati accertati con crescente frequenza, con almeno 10 epidemie sostenute da *Influenzavirus A H5 HPAI* ed importanti eventi di mortalità di massa (Verhagen et al., 2021). Se fino al 2009 l'AI era principalmente sostenuta dal sottotipo H5N1, clade 2.2, dal 2014 in poi la maggior parte dei focolai a livello europeo è il risultato di infezioni sostenute da virus HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b, lignaggio ormai predominante a livello globale avente spiccati caratteri di patogenicità, nonché marcatori genetici di adattamento ai mammiferi (Consortium et al., 2024; EFSA, 2023; EFSA et al., 2023b; EFSA et al., 2023c; Lee et al., 2017).

In Europa e in Italia, dal 2020 i focolai di WNV e USUTU negli uccelli selvatici e nell'uomo sono aumentati. In modo particolare durante il 2023, 709 casi di WNV nell'uomo sono stati segnalati in nove paesi dell'Unione europea, 366 dei quali in Italia. Tale numero, inferiore rispetto alla casistica registrata nel 2022 e nel 2018, risulta però distribuito su una più ampia estensione territoriale, indice dell'introduzione e dell'endemizzazione del virus in nuovi areali (ECDC, 2019; EFSA et al., 2023a). Considerando questo aspetto, nonché l'aumento nell'incidenza e nella gravità dei sintomi, WNV e USUTU devono essere considerate serie minacce emergenti per la salute umana (Nikolay, 2015).

Al fine di prevenire l'insorgenza di focolai di Influenza Aviaria, West Nile Disease e USUTU negli animali di interesse zootecnico, negli animali d'affezione e nell'uomo, è necessario un sistema di sorveglianza ben strutturato, costituito da misure attive e passive indirizzate anche, e soprattutto, all'avifauna. Il monitoraggio degli uccelli selvatici risulta essere, infatti, di primaria importanza: il controllo dello stato sanitario dell'avifauna fornisce un sistema di allerta precoce di minacce, potenziali o reali, esistenti nelle popolazioni *reservoir* (Giglia et al., 2022; Hoyer et al., 2010; Mancuso et al., 2022; Rose et al., 2006).

Nonostante il monitoraggio passivo, adottato nella presente indagine, presenti limiti e criticità intrinseci, quali la lunghezza dell'iter procedurale e la possibile eterogeneità del campione a causa della differente numerosità e distribuzione delle specie aviarie sul territorio (Poulson et al., 2020; Rose et al., 2006), le informazioni ricavabili tramite l'applicazione dello stesso sono di utilità indubbia, come dimostrato anche dai risultati ottenuti nel presente studio. L'integrazione di tali misure con quelle previste dalla sorveglianza attiva, basata sull'effettuazione di analisi sierologica su animali vivi, potrebbe riuscire a completare efficacemente il quadro epidemiologico dell'influenza aviaria, di West Nile disease e di USUTU nel territorio considerato, con conseguente tutela della salute pubblica, umana e animale (Hoye et al., 2010; Mancuso et al., 2022)

## BIBLIOGRAFIA

1. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A, Hourfar MK, Weidner L, Nowotny N. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance*. 2018;23:1800545.
2. Abolnik C. A current review of avian influenza in pigeons and doves (Columbidae). *Veterinary Microbiology*. 2014;170:181-196.
3. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 2007;25:5637-5644.
4. Artois M, Bicout D, Doctrinal D, Fouchier R, Gavier-Widen D, Globig A, Hage-meijer W, Mundkur T, Munster V, Olsen B. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe: the risks associated with wild birds. *Revue scientifique et technique*. 2009;28:69-92.
5. Bertran K, Dolz R, Busquets N, Gamino V, Vergara-Alert J, Chaves AJ, Ramis A, Abad XF, Höfle U, Majó N. Pathobiology and transmission of highly and low pathogenic avian influenza viruses in European quail (*Coturnix c. coturnix*). *Veterinary Research*. 2013;44:23.
6. Blagodatski A, Trutneva K, Glazova O, Mityaeva O, Shevkova L, Kegeles E, Onyanov N, Fede K, Maznina A, Khavina E, Yeo SJ, Park H, Volchkov P. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology in Pathogens. *Science in One Health*. 2021;2:100043.
7. Bowen RA, Nemeth NM. Experimental infections with West Nile virus. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2007;20.
8. Brambilla M, Longoni V, Calvi G, Ambrosini R, Rubolini D. Il censimento International Waterbird Census (IWC) in Lombardia nel 2023. *Regione Lombardia, Milano*. 2023.
9. Cardona CJ, Xing Z, Sandrock CE, Davis CE. Avian influenza in birds and mammals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2009;32:255-273.
10. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, Baldet T, Foulongne V, Simonin Y. Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and Infection*. 2019;147.
11. ENETWILD Consortium, et al. The role of mammals in Avian Influenza: a review. *EFSA Supporting Publications*. 2024;21:8692E.
12. Dauphin G, Zientara S, Zeller H, Murgue B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;27:343-355.

13. Del Amo J, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Llorente F, Agüero M, Jiménez-Clavero MA. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *Journal of Virological Methods*. 2013;189:321-327.
14. Duan C, Li C, Ren R, Bai W, Zhou L. An overview of avian influenza surveillance strategies and modes. *Science in One Health*. 2023;2:100043.
15. ECDC. West Nile virus infection in ECDC. Annual epidemiological report for 2018. *European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC, Stockholm*. 2019.
16. EFSA. Annual report of the Scientific Network on Animal Health 2023. In: EFSA Supporting Publications. *John Wiley & Sons, Ltd*. 2023.
17. EFSA, ECDC. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. In: *EFSA Journal*. John Wiley & Sons, Ltd. 2023.
18. EFSA, ECDC, EURL, et al. Avian influenza overview December 2022 – March 2023. In: *EFSA Journal*. John Wiley & Sons, Ltd. 2023.
19. EFSA, ECDC, EURL, et al. Avian influenza overview March – April 2023. In: *EFSA Journal*. John Wiley & Sons, Ltd. 2023.
20. EFSA, ECDC, EURL, et al. Avian influenza overview September – November 2017. In: *EFSA Journal*. *John Wiley & Sons, Ltd*. 2017.
21. Faggioni G, De Santis R, Pomponi A, Grottola A, Serpini GF, Meacci M, Gennari W, Tagliazucchi S, Pecorari M, Monaco F, Savini G, Benedetti E, Remoli ME, Fortuna C, Venturi G, Rezza G, Lista F. Prevalence of Usutu and West Nile virus antibodies in human sera, Modena, Italy, 2012. *Journal of Medical Virology*. 2018;90:1666-1668.
22. Feare CJ, Yasué M. Asymptomatic infection with highly pathogenic avian influenza H5N1 in wild birds: how sound is the evidence? *Virology Journal*. 2006;3:96.
23. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*. 2005;79:2814-2822.
24. França MS, Brown JD. Influenza pathobiology and pathogenesis in avian species. In: Compans RW, Oldstone MBA, eds. *Influenza pathogenesis and control-Volume I*. Springer; 2014:221-242.
25. Fros JJ, Miesen P, Vogels CB, Gaibani P, Sambri V, Martina BE, Koenraadt CJ, van Rij RP, Vlak JM, Takken W, Pijlman GP. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health*. 2015;1:31-36.
26. Giglia G, Mencattelli G, Lepri E, Agliani G, Gobbi M, Gröne A, van den Brand JMA, Savini G, Mandara MT. West Nile Virus and Usutu Virus: A Post-Mortem Monitoring Study in Wild Birds from Rescue Centers, Central Italy. *Viruses*. 2022.
27. Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, Monaco F, Marchegiano P, Marini V, Meacci M, Rumpianesi F, Lorusso A, Pecorari M, Savini G. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23:33-37.
28. Hoyer BJ, Munster VJ, Nishiura H, Klaassen M, Fouchier RA. Surveillance of wild birds for avian influenza virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16:1827-1834.
29. Jourdain E, Gauthier-Clerc M, Bicout DJ, Sabatier P. Bird migration routes and

- risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13:365-372.
30. Jourdain E, Toussaint Y, Leblond A, Bicout D, Sabatier P, Gauthier-Clerc M. Bird Species Potentially Involved in Introduction, Amplification, And Spread of West Nile Virus in A Mediterranean Wetland, The Camargue (Southern France). *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2007;7:15-33.
  31. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9:311-322.
  32. Komar N, Panella NA, Burns JE, Dusza SW, Mascarenhas TM, Talbot TO. Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7:621-625.
  33. Leblond A, Hendriks P, Sabatier P, West Nile Virus Surveillance in Birds in France, 2002. *Epidemiology and Infection*. 2007;135:1-11.
  34. Leblond A, Sabatier P. Evaluation of the risk of West Nile Virus infection for humans in Camargue. *Médecine Tropicale: Revue du Corps de santé colonial*. 2003;63:355-359.
  35. Leblond A, Hendriks P, Sabatier P, West Nile Virus Surveillance in Wild Birds in the Camargue, France. *Epidemiology and Infection*. 2007;135:1-11.
  36. Martina BEE, van den Doel P, Koraka P, et al. DC-SIGN enhances infection of cells with glycosylated West Nile virus in vitro and virus replication in human dendritic cells induces production of IFN- $\alpha$  and TNF- $\alpha$ . *Virus Research*. 2008;135:64-71.
  37. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7:692-696.
  38. Petrović T, Blázquez AB, Lupulović D, Lazić S, Escribano-Romero E, Fabijan D, Kapetanov M, Lazić G, Saiz JC, Petrović V. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Eurosurveillance*. 2013;18:20622.
  39. Pfeiffer D, Stevens KB, Laudoisot A, et al. Spatial and temporal epidemiology of West Nile virus in horses in Belgium in 2010. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;111:102-108.
  40. Pinto J, Serra-Cobo J, Oliveira R, Lopes AM, Isomursu M, Cardador L, Tagliapietra V, Segalés J, Tenorio A, Domingo M, Jiménez-Clavero MA, Figuerola J, Tavares L, Palmeirim JM, A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Transboundary and Emerging Diseases*. 2023.
  41. Pohl D, Heinemann P, Gross J, Gethmann JM, Lierz M, Hlinak A, et al. Usutu virus in migratory birds in Germany: preliminary assessment of an increasing risk for zoonotic infections. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2019;19:170-174.
  42. Ramakrishnan S, Bharathi M, Borkakoty B, Vijayarani H, Yadav MP, Singh NK. Co-circulation of West Nile virus and dengue virus in Kolar district, Karnataka, India. *Journal of Infection and Public Health*. 2013;6:154-159.
  43. Remoli ME, Fortuna C, Di Luca M, et al. Experimental studies on comparison of the vector competence of four Italian *Culex pipiens* populations for West Nile virus. *Parasites & Vectors*. 2014;7:1-8.
  44. Remoli ME, Fortuna C, Marchi A, et al. Evaluation of vector competence for West

- Nile virus in Italian *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology*. 2015;29:430-433.
45. Rizzoli A, Rosà R, Rosso F, et al. West Nile virus circulation in Veneto region in 2008–2009. *Epidemiology and Infection*. 2011;139:818-825.
  46. Rosen L. The natural history of Japanese encephalitis virus. *Annual Review of Microbiology*. 1986;40:395-414.
  47. Rukke BA, Bøe A, Mangus L, Berg T, Czajkowski R, Strauss B, Karlsson L, Rimstad E, Brun E. Usutu virus in the breeding population of herons at a bird sanctuary in Norway. *Journal of Wildlife Diseases*. 2022.
  48. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, Fyodorova M, Gaibani P, Gould E, Niedrig M, Papa A, Pierro A, Rossini G, Varani S, Vocale C, Landini MP. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19:699-704.
  49. Sedlak K, Bartunek P, Simek J, et al. Serological monitoring of West Nile virus in horses in the Czech Republic between 2011 and 2013. *BMC Veterinary Research*. 2015;11:173.
  50. Spackman E, McCracken KG, Winker K, Swayne DE. An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages. *Avian Diseases*. 2006;50:309-313.
  51. Steullet P, Hauser P, Seewer R, Wyss J, Heinzerling L, Stäuber N, Schwermer H, Ryser-Degiorgis MP. West Nile fever among wild birds in Switzerland: monitoring of the Usutu and West Nile virus through an integrated surveillance programme from 2013 to 2016. *Swiss Archives of Veterinary Medicine*. 2018;160:113-120.
  52. Tamba M, Bonilauri P, Bellini R, Calzolari M, Albieri A, Sambri V, Dottori M, Angelini P, Lelli D. Detection of Usutu, Sindbis, and Batai Viruses in Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected in Northern Italy. *Viruses*. 2020;12:641.
  53. Tamba M, Faccin F, Di Rocco F, Manica M, Pagni F, Bertolini S, Bonilauri P, Brugnetta V, Calzolari M, Cagarelli R, Angelini P, Dottori M, Sambri V, Bellini R. Usutu virus infections in Italy: Retrospective analysis on mosquitoes and birds, 2009–2018. *Microorganisms*. 2020;8:100.
  54. Tamba M, Grisenti M, Pascutto C, et al. Monitoring of West Nile virus and Usutu virus in waterfowl used as decoys and wild raptors in southern Italy. *Veterinary Medicine and Science*. 2023.
  55. Tamba M, Pascutto C, Capelli G, et al. Circulation of Usutu virus in northern Italy: the 2020–2021 situation. *Heliyon*. 2022;8
  56. Tamba M, Tartera G, Llorente F, et al. Detection of Usutu Virus Lineage 2 in Blackbirds (*Turdus merula*) in Northern Spain, 2020. *Pathogens*. 2021;10:554.
  57. Tamba M, Tartera K, Vázquez A, et al. Monitoring of Usutu Virus (USUV) in wild birds in Catalonia (Northeast Spain) from 2020 to 2021. *Microorganisms*. 2022;10:1972.
  58. Tariq A, Hussain A, Adnan M, Siddique N, Zhou Y, Ahmad N, Ullah S. The Epidemiology and Emergence of Avian Influenza in Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*. 2019;51:513-519.
  59. Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ. Global traffic and disease vector dispersal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:6242-6247.
  60. Tizzani P, Fabrizi C, Frasca F, et al. West Nile Virus Surveillance in Mosquitoes in

- the Autonomous Province of Trento, Northern Italy, 2003–2016. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2019;19:623-629.
61. Veronesi E, Paslaru A, Silaghi C, Tobler K, Glavinic U, Torgerson P, Mathis A. Experimental evaluation of infection, dissemination, and transmission rates for two West Nile virus strains in European *Aedes japonicus* under a fluctuating temperature regime. *Veterinary Research*. 2020;51:5.
  62. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, et al. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2002;8:652-656.
  63. Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, et al. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19:274-277.
  64. Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D, et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerging Infectious Diseases*. 2001;7:686-691.
  65. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;23:147-156.
  66. Ziegler U, Seidowski D, Angenwoort J, et al. Monitoring of West Nile Virus Infections in Germany, 2014–2017. *Viruses*. 2018;10:489.
  67. Ziegler U, Jöst H, Müller K, Fischer D, Rinder M, Tietze DT, Danner KJ, Becker N, Skuballa J, Hamann HP, Bosch S, Fast C, Eiden M, Schmidt-Chanasit J, Groschup MH. Epidemic Spread of Usutu Virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and Monitoring of Wild Birds for Usutu and West Nile Viruses. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2015;15:481-488.

# CARATTERIZZAZIONE DELL'INTERFACCIA UCCELLI DOMESTICI-FAUNA SELVATICA IN UN'AREA AD ELEVATO RISCHIO DI INTRODUZIONE DI INFLUENZA AVIARIA

Graziosi G.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Dalla Favera F.<sup>1</sup>, Martini G.<sup>2</sup>, Dosa G.<sup>2</sup>, Trevisani G.<sup>3</sup>, Garavini G.<sup>3</sup>, Mannelli A.<sup>4</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>*Unità Operativa Complessa Igiene Veterinaria, A.U.S.L. di Imola, viale Giovanni Amendola 2, 40026 Imola, BO, Italia;*

<sup>3</sup>*Servizi Veterinari del Gruppo Eurovo, via Ugo la Malfa 15, 40026 Imola, BO, Italia;*

<sup>4</sup>*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, via Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco, TO, Italia*

## Summary

Direct or indirect interactions between poultry and wildlife can lead to interspecies disease transmission, with implications for animal and public health. Avian influenza (AI) is a viral epidemic disease for which the poultry-wild bird interface shapes the risks of new viral introductions into poultry holdings. Given this background, this study aimed to identify wild bird and mammal species occurring near poultry houses and characterize their spatiotemporal visit patterns. Eight camera traps were deployed for a year (January to December 2021) in three commercial chicken layer farms, including free-range and barn-type setups, in a densely populated poultry area of Northern Italy at high risk for AI introduction via wild birds. Various methods, including time series analysis and generalized linear models, were used to analyze the daily wildlife visits and to identify influential variables. A total of 1,958 camera trap days yielded 5,978 videos of wild birds of 27 species and 16 families, predominantly engaged in foraging activities. Eurasian magpies, ring-necked pheasants, and Eurasian collared doves were the most frequent visitors. Wild bird visits increased during spring and winter, influenced by the farm and camera trap location. Additionally, 567 videos of wild mammals and 1,866 videos of domestic pets (cats and dogs) were obtained. Coypus and cats were most frequently observed, with wild mammal visits significantly increasing at night and slightly decreasing in spring. These results highlight the species that could be prioritized for epidemiological surveys and underline the importance of diligent application and implementation of biosecurity measures. These data lay groundwork for designing novel surveillance and intervention strategies to prevent cross-species disease transmission and might assist health authorities in raising awareness about potential pathogen spillover risks.

## INTRODUZIONE

Contatti diretti o indiretti tra animali domestici allevati e fauna selvatica possono determinare la trasmissione interspecifica di agenti infettive, con conseguenti implicazioni di sanità animale e pubblica (Craft, 2015; Daszak, 2000). Per gli uccelli domestici, i volatili ed i mammiferi selvatici possono svolgere un ruolo di vettore o serbatoio epidemiologico di diversi patogeni sia virali che batterici (Ayala et al., 2020; Graziosi et al., 2022a; Graziosi et al., 2022b; Tucciarone et al., 2022). Tra questi, il virus dell'influenza aviaria (avian influenza virus, AIV) presenta come reservoir gli uccelli acquatici selvatici degli ordini Anseriformes (anatre, oche e cigni) e Charadriiformes (limicoli, gabbiani e sterne). A partire dal 2020, la persistente circolazione di virus influenzali ad alta patogenicità (*highly pathogenic avian influenza virus*, HPAI) in volatili selvatici migratori ha

determinato una diffusione globale di virus H5Nx del clade 2.3.4.4b con frequenti introduzioni virali in allevamenti avicoli (Caliendo et al., 2022; European Food Safety Authority et al., 2023). Per i mammiferi selvatici, ceppi patogeni di *Pasteurella multocida* o agenti di zoonosi quali *Salmonella* spp. e *Leptospira* spp. sono stati isolati da individui campionati in allevamenti avicoli (Domanska-Blicharz et al., 2023; Snipes et al., 1988). Alla luce di queste premesse, il presente studio ha avuto l'obiettivo di caratterizzare l'interfaccia tra uccelli domestici e fauna selvatica in tre allevamenti di galline ovaiole situati in un'area dell'Emilia-Romagna ad alta densità di allevamenti avicoli. Lo studio, svolto mediante l'utilizzo di video-trappole collocate in diversi siti di ciascun allevamento, ha avuto come obiettivo l'identificazione delle specie di uccelli e mammiferi selvatici presenti nei dintorni dei capannoni, la descrizione dei loro comportamenti e la caratterizzazione spazio-temporale delle visite.

## **MATERIALI E METODI**

### *Piano sperimentale*

Lo studio è stato condotto in tre allevamenti di galline ovaiole della provincia di Bologna, identificati come Allevamento 1, Allevamento 2 ed Allevamento 3. Questi sono stati selezionati randomicamente fra 20 allevamenti avicoli di competenza della Unità Operativa Complessa di Igiene Veterinaria dell'A.U.S.L. di Imola, dove era stata segnalata la presenza di fauna selvatica nelle vicinanze. Lo studio è stato svolto dopo aver ottenuto l'autorizzazione a procedere da parte dell'Azienda. I tre allevamenti arruolati erano localizzati in "Zona B", ad alto rischio di introduzione e di maggiore diffusione di AI, secondo l'Accordo Stato-Regioni rep. Atti n. 125 del 25 luglio 2019 (<https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2019&codLeg=71728&parte=1&serie=>). L'Allevamento 1 era sito in vicinanza di un laghetto di pesca sportiva e, come l'Allevamento 3, prevedeva una conduzione degli animali al chiuso in voliera. L'Allevamento 2 risultava invece di tipo biologico, con accesso all'esterno consentito alle galline in base alla situazione epidemiologica della IA. Sei video-trappole (Dark-Ops Pro XD Dual Lens, Browning Trail Cameras, UT), due per allevamento, sono state collocate nella zona di raccolta della pollina e vicino ai silos del mangime. Inoltre, una ulteriore video-trappola è stata installata all'interno di uno dei parchetti esterni dell'Allevamento 2, ed un'altra in prossimità del lato di un capannone dell'Allevamento 1 rivolto verso il laghetto di pesca sportiva sopra-citato. Le video-trappole sono state attive 24/24 ore da gennaio e dicembre 2021, e permettevano l'acquisizione di filmati della durata di 30 secondi.

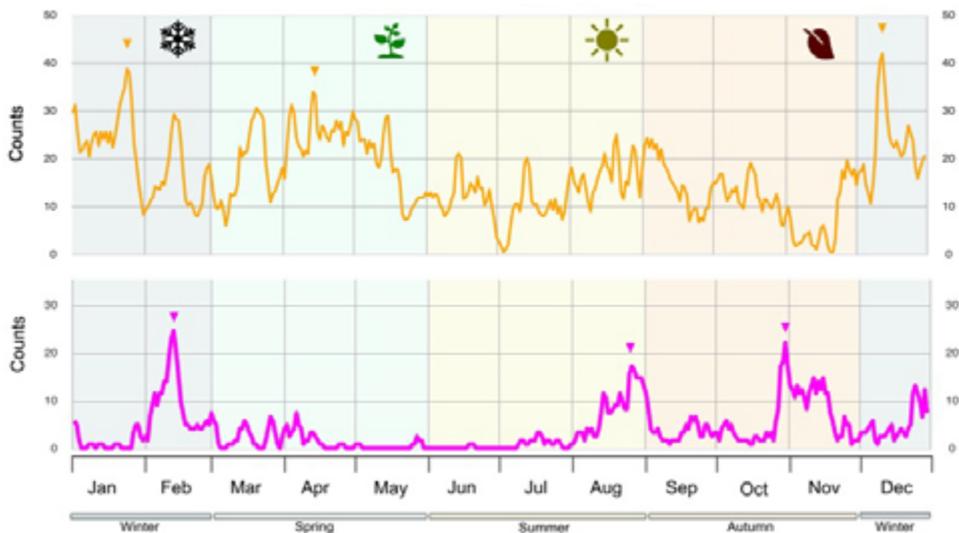
### *Analisi dei dati*

I filmati ottenuti sono stati visionati mediante l'utilizzo del software Timelapse Image Analyzer (Greenberg & Godin, 2012) per l'acquisizione di dati di interesse, i quali sono stati analizzati mediante l'utilizzo di GraphPad Prism ed il software R. Per ciascun video, le seguenti informazioni sono state registrate: data ed ora (hh:mm) della visita, tipo di visitatore (uomo, volatile selvatico, mammifero selvatico, gatto o cane), specie, e comportamento osservato. I filmati riguardanti esseri umani sono stati esclusi da ulteriori analisi e rimossi, in conformità con le normative sulla privacy vigenti. Una volta ottenuto il dataset completo, per ciascuna specie selvatica osservata è stato calcolato il numero di visite medie nel corso dell'anno di indagine e la percentuale di ciascun comportamento mostrato sul totale dei comportamenti. Al fine di valutare l'andamento del numero di visite di fauna selvatica nel corso delle diverse stagioni, è stata eseguita un'analisi delle serie temporali, mediante l'utilizzo della media mobile delle osservazioni su tre mesi. Infine, due modelli generalizzati lineari, uno per i dati riguardanti i volatili selvatici ed un altro per quelli dei mammiferi, sono stati utilizzati per testare la dipendenza della variabile risposta (numero di

visite giornaliere) con diverse variabili esplicative, quali stagione dell'anno (estate ed autunno, inverno e primavera), posizione della video-trappola, orario della visita, ed allevamento studiato.

## RISULTATI

Nel corso del periodo di studio, 33.519 filmati sono stati acquisiti nei tre allevamenti arruolati. Un totale di 5.978 (17.8% del totale) filmati hanno riguardato volatili selvatici, 567 (1.7%) mammiferi selvatici, e 1.866 (5.5%) cani e gatti. Per quanto riguarda gli uccelli selvatici, sono state identificate 27 specie, appartenenti a 16 diverse famiglie tassonomiche: Anatidae, Ardeidae, Columbidae, Corvidae, Falconidae, Fringillidae, Motacillidae, Muscipidae, Passeridae, Phasianidae, Rallidae, Strigidae, Sturnidae, Threskiornithidae, Turdidae, e Upupidae. I filmati hanno mostrato in prevalenza visite di individui di gazza euroasiatica (*Pica pica*), di tortore dal collare orientale (*Streptopelia decaocto*) e di fagiani (*Phasianus colchicus*). Volatili acquatici selvatici, quali il germano reale (*Anas platyrhynchos*), l'airone cenerino (*Ardea cinerea*) e l'ibis sacro (*Threskiornis aethiopicus*) sono stati osservati solamente nell'Allevamento 1, con rare visite durante il periodo primaverile. Il comportamento più frequentemente osservato è risultato essere la ricerca e l'assunzione di cibo. Per quanto riguarda i mammiferi è stato possibile osservare esclusivamente la presenza di nutrie (*Myocastor coypus*), ricci (*Erinaceus europaeus*), ratti o topi (*Rattus* spp., *Apodemus* spp., *Mus* spp.), lepri (*Lepus europaeus*), volpi (*Vulpes vulpes*) e faine (*Martes foina*). A differenza dei volatili selvatici, la maggior parte dei mammiferi è stata osservata nell'atto di attraversare il campo visivo della video-trappola. L'analisi delle serie temporali (Figura 1) ha mostrato, per gli uccelli selvatici, un aumento del numero medio di visite giornaliere nel corso del tardo autunno-inizio inverno e durante la primavera. Per i mammiferi, il picco di visite era osservato durante i mesi invernali. La localizzazione della video-trappola in allevamento e la stagione monitorata sono risultate variabili significativamente influenti rispetto al numero di visite giornaliere di fauna selvatica.



**Figura 1.** Media mobile su tre mesi delle visite giornaliere di uccelli (grafico a linee superiore, in arancione) e mammiferi (grafico a linee inferiore, in rosa) nei tre allevamenti di galline ovaiole studiati.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la caratterizzazione dell'interfaccia uccelli domestici allevati/fauna selvatica in allevamenti di galline ovaiole siti in un'area ad elevato rischio di introduzione di IA. Mediante l'osservazione di filmati ottenuti da video-trappole collocate nell'area di allevamento, è stata descritta la varietà di volatili e mammiferi selvatici frequentanti i siti studiati, descrivendone i comportamenti e quantificando le visite giornaliere. I volatili selvatici più frequentemente osservati sono stati uccelli sinantropi (gazze e tortore dal collare) e fagiani. Trattasi di specie ad attitudine stanziale, sensibili alle infezioni da virus influenzali aviari e quindi potenzialmente coinvolte nella trasmissione virale tra allevamenti e tra volatili selvatici (Shriner & Root, 2020). Tra queste, la gazza è infatti inclusa nella lista di specie target per la sorveglianza passiva dell'IA negli uccelli selvatici (European Food Safety Authority et al., 2017). Le abitudini alimentari di tali specie, che includono una dieta ricca in fonti proteiche e granaglie, le rendono inclini alla ricerca di alimento negli allevamenti avicoli dove sono presenti residui di mangime, pollina, e, in particolare nel caso degli allevamenti di galline ovaiole, uova cadute dal sistema di trasporto automatico delle stesse dai capannoni al centro di imballaggio. Durante lo studio sono stati osservati anche volatili acquatici selvatici, quali il germano reale (*A. platyrhynchos*) e l'airone cenerino (*A. cinerea*). Queste specie sono state osservate esclusivamente nell'Allevamento 1, confinante con un lago di pesca sportiva. La maggior parte delle osservazioni di mammiferi hanno riguardato nutrie (*M. coypus*), ricci (*E. europaeus*) e ratti. Dal punto di vista comportamentale, a differenza degli uccelli, i mammiferi hanno mostrato una scarsa attività di foraggiamento presso le aree dei silos o di raccolta di pollina. La presenza di questi individui entro i confini dell'allevamento può essere ricondotta all'ambiente del sito di allevamento. In particolare, la presenza delle nutrie si ritiene essere legata alla presenza di prati utili per il foraggiamento, di canali di irrigazione o di zone rifugio rappresentate dai canali di scolo. Dal punto di vista della sensibilità all'infezione da virus influenzali di questi mammiferi, se per la nutria non ci sono ancora evidenze che lo dimostrino, in ratti è stata evidenziata sieroconversione a seguito ad infezione con virus influenzali di tipo A (Root & Shriner, 2020). Anche il trasporto meccanico del virus da parte di diversi mammiferi può rappresentare un fattore di rischio di introduzione di IA in allevamento (Velkers et al., 2017).

I dati ottenuti con questo lavoro hanno consentito una migliore comprensione dei possibili scenari alla base di eventi di *spillover* dalla fauna selvatica agli uccelli domestici, e potranno permettere di formulare specifiche ipotesi di prevenzione e controllo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ayala AJ, Yabsley MJ, Hernandez SM. A Review of Pathogen Transmission at the Backyard Chicken-Wild Bird Interface. *Front Vet Sci.* 2020;7:539925.
2. Caliendo V, Lewis NS, Pohlmann A, Baillie SR, Banyard AC, Beer M, et al. Transatlantic spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wild birds from Europe to North America in 2021. *Scientific Reports.* 2022;12(1):11729.
3. Craft ME. Infectious disease transmission and contact networks in wildlife and livestock. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1669).
4. Daszak P. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science.* 2000;287. Domanska-Blicharz K, Opolska J, Lisowska A, Szczotka-Bochniarz A. Bacterial and Viral Rodent-borne Infections on Poultry Farms. An Attempt at a Systematic Review. *J Vet Res.* 2023;67(1):1-10.
5. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control,

- European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Brown I, Kuiken T, Mulatti P, et al. Avian influenza overview September - November 2017. *EFSA J.* 2017;15(12).
6. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoch C, Fusaro A, Gonzales JL, et al. Avian influenza overview December 2022 - March 2023. *EFSA J.* 2023;21(3).
  7. Graziosi G, Catelli E, Fanelli A, Lupini C. Infectious bursal disease virus in free-living wild birds: A systematic review and meta-analysis of its sero-viroprevalence on a global scale. *Transbound Emerg Dis.* 2022;69(5):2800-2815.
  8. Graziosi G, Lupini C, Catelli E. Disentangling the role of wild birds in avian metapneumovirus (aMPV) epidemiology: A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis.* 2022;69(6):3285-3299.
  9. Greenberg S, Godin T. Timelapse Image Analysis Manual. *Technical Report* 2012-1028-11. 2012.
  10. Root J, Shriner S. Avian Influenza A Virus Associations in Wild, Terrestrial Mammals: A Review of Potential Synanthropic Vectors to Poultry Facilities. *Viruses.* 2020;12(12). doi:10.3390/v12121352
  11. Shriner SA, Root JJ. A Review of Avian Influenza A Virus Associations in Synanthropic Birds. *Viruses.* 2020;12(11).
  12. Snipes KP, Carpenter TE, Corn JL, Kasten RW, Hirsh DC, Hird DW, et al. *Pasteurella multocida* in Wild Mammals and Birds in California: Prevalence and Virulence for Turkeys. *Avian Diseases.* 1988;32(1):9-15.
  13. Tucciarone CM, Franzo G, Legnardi M, Pasotto D, Lupini C, Catelli E, et al. Molecular Survey on A, B, C and New Avian Metapneumovirus (aMPV) Subtypes in Wild Birds of Northern-Central Italy. *Vet Sci.* 2022;9(7).
  14. Velkers FC, Blokhuis SJ, Veldhuis Kroeze EJB, Burt SA. The role of rodents in avian influenza outbreaks in poultry farms: a review. *Vet Q.* 2017;37(1):182-194.

# EVIDENZE SIEROLOGICHE DELLA CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV) IN BROILER IN ITALIA

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1-2</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Poletto F.<sup>1</sup>, Miccio L.<sup>3</sup>, Busquet M.<sup>4</sup>, Carceller E.<sup>4</sup>, Dardi M.<sup>4</sup>, Solé M.<sup>4</sup>, Pasotto D.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro 35020, PD, Italia

<sup>3</sup> HIPRA Italia S.r.l., Brescia 25030, Italia

<sup>4</sup> HIPRA S.A., Amer 17170, Spagna

## Summary

The relevance of Avian Metapneumovirus (aMPV) in the poultry sector is growing, particularly in the broiler industry where vaccination is not adopted. Under these premises, a serological study was conducted in the densely populated area of Northern Italy to evaluate the circulation of aMPV. Blood samples were collected towards the end of the production cycle in broiler farms, that were sampled again in the following season to assess any seasonality. Seven farms were selected and all tested positive, with seroprevalence ranging from 26.6% to 100% and higher antibody titers with increasing age of the animals, without seasonality. These results suggest that aMPV circulation might be widespread and persist in the farm, regardless of the season, with factors related to the individual farm shaping the prevalence. Moreover, this study highlights the utility of serological monitoring in a productive branch where vaccination is not yet applied.

## INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV) è un patogeno respiratorio che colpisce primariamente tacchino e pollo, appartenente al genere *Metapneumovirus*, recentemente rinominato *Metapneumovirus avis*. L'infezione provoca principalmente sintomi respiratori e prende il nome di *turkey rhinotracheitis* (TRT) nel tacchino, mentre quando aMPV è in coinfezione con altri patogeni può causare nel pollo la forma nota come *swollen head syndrome* (SHS) (Suarez et al., 2020). aMPV può inoltre indurre disordini riproduttivi e favorire infezioni secondarie, giustificando l'utilità della vaccinazione che viene generalmente adottata nei tacchini, anche da carne, ai quali possono essere somministrati vaccini vivi attenuati via spray, acqua da bere o goccia oculare (Kaboudi e Lachheb, 2021) e in animali a lunga vita come breeders e ovaiole (Cook et al., 2000), con l'adozione di vaccini spenti dopo una prima somministrazione di vaccini vivi (Jones, 2010).

La vaccinazione è uno strumento utile per contenere segni clinici e perdite legate all'infezione da aMPV, per quanto non possa prevenirla (Mernizi et al., 2023). Talvolta può però presentare alcuni svantaggi, legati a reazioni vaccinali, circolazione e più raramente reversione a virulenza del vaccino (Catelli et al., 2006). Infatti, come per altri patogeni (Legnardi et al., 2020), procedure di vaccinazione svolte in modo subottimale e coverage parziale degli animali pregiudicano il livello di protezione e causano un passaggio virale all'interno del gruppo di animali; di conseguenza, reazioni avverse e episodi di sintomatologia clinica possono seguire la vaccinazione, con la persistenza del vaccino in campo (Catelli et al., 2006; Naylor et al., 1997; Lupini et al., 2022).

Negli anni, sono stati identificati diversi sottotipi (A-D) di aMPV sulla base di variazioni genetiche e antigeniche (Bayon-Auboyer et al., 2000; Toquin et al., 2006; Juhasz e Easton, 1994). Recentemente, sono stati identificati due nuovi sottotipi, in gabbiani e parrocchetti (Canuti et al., 2019; Retallack et al., 2019). L'interesse verso aMPV sta crescendo, data la recente comparsa dei sottotipi A e B con gravi conseguenze per il settore produttivo negli Stati Uniti (Luqman et al., 2024), dove precedentemente circolava solo il sottotipo C nella popolazione domestica e selvatica.

Il pollo da carne risulta particolarmente esposto ad aMPV, soprattutto in regioni come il Nord Italia, dove la densità di allevamenti di diverse specie e tipologie produttive è molto elevata (Tucciarone et al., 2018). Inoltre, il broiler non viene comunemente vaccinato contro aMPV (Tucciarone et al., 2018), al contrario di ovaiole e riproduttori (Cook et al., 2000), e la presenza di aMPV può contribuire marcatamente al complesso delle malattie respiratorie, compromettendo produttività e salute animale (Saif, 2017). Partendo dalla condizione naïve della popolazione di broiler del Nord Italia, è stato condotto uno studio sierologico per la ricerca di anticorpi contro aMPV, valutandone la circolazione e la persistenza in stagioni successive.

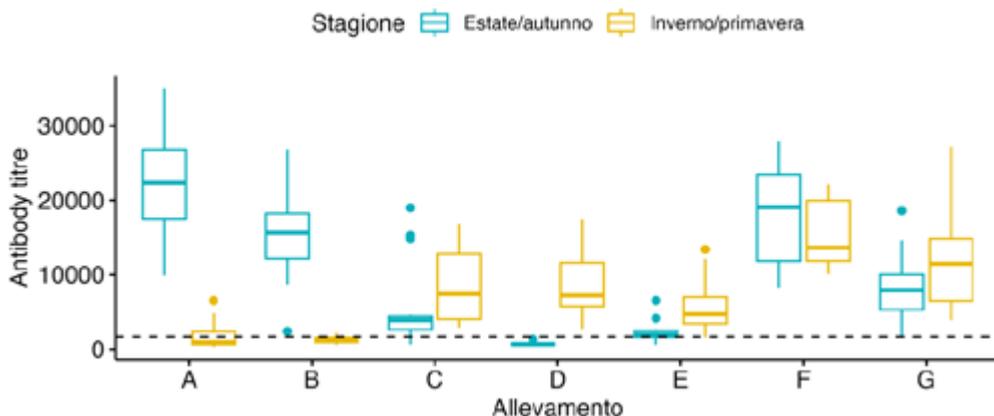
## **MATERIALI E METODI**

Durante l'estate/autunno 2022 sono state selezionate sette aziende di broiler nel Nord Italia, campionando gli animali al raggiungimento minimo di 40 giorni di età. Ogni azienda è stata campionata successivamente in inverno/primavera 2023. Sono stati raccolti 15 campioni di sangue per gruppo, stimando una sieroprevalenza del 35% con una popolazione di 10.000 individui per gruppo, assumendo specificità e sensibilità del test del 95% per determinare la presenza o assenza della circolazione virale (<https://epitools.ausvet.com.au/freecalctwo>).

I campioni sono stati centrifugati, sierati, conservati a -20° C e trasferiti al Laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università di Padova (Legnaro). I campioni sono stati analizzati in due momenti separati (estate/autunno e inverno/primavera) con il kit ELISA Avian Rhinotracheitis Antibody test kit (BioChek BV, Paesi Bassi). I titoli anticorpali sono stati calcolati secondo le indicazioni del manuale e considerati positivi con valori maggiori o uguali a 1.656. È stato predisposto un database su Microsoft Excel® che raccogliesse i risultati, l'identificativo aziendale, il capannone, l'età degli animali, la data e la presenza di segni clinici respiratori durante il ciclo produttivo. La presenza di un effetto legato all'azienda o alla stagione sui titoli anticorpali è stata valutata con il test non parametrico di Scheirer-Ray-Hare in R (R Core Team, 2018), considerando come livello di significatività  $p < 0.05$ . Il test post-hoc di Dunn con correzione di Bonferroni è stato usato per valutare la significatività delle differenze.

## **RISULTATI**

Le sette aziende di broiler selezionate sono state campionate tra agosto e ottobre 2022 e nuovamente tra febbraio e maggio 2023, per un totale di 210 sieri raccolti. L'età media degli animali era di 46.4 giorni (min=41, max=61, mediana=45.5): al campionamento in estate/autunno la media era di 44 giorni (min=41, max=49, mediana=43), mentre al secondo campionamento, la media era di 48.9 giorni (min=44; max=61; mediana=47). Tutte le aziende erano positive in entrambi i campionamenti, tranne l'azienda D, negativa al primo (Tab. 1, Fig. 1).

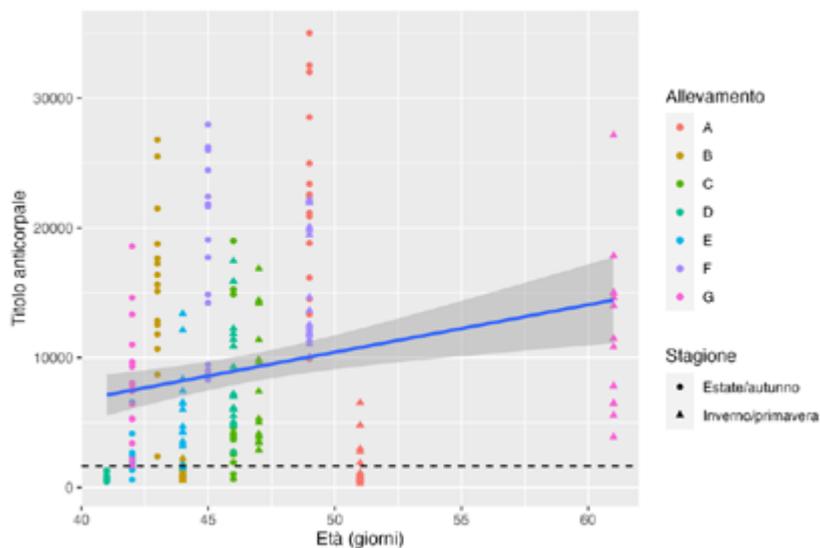


**Figura 1.** Distribuzione dei titoli anticorpali nei due punti di campionamento per azienda. I campioni con titolo inferiore al cut-off del kit (1656; linea nera tratteggiata) sono considerati negativi.

In due aziende (A, B), la prevalenza estiva/autunnale era superiore a quella invernale/primaverile, contrariamente a tre aziende (C, D, E) in cui un numero maggiore di animali è risultato positivo al secondo campionamento. Due aziende (F, G) hanno mostrato una prevalenza del 100% in entrambi i punti di campionamento. I titoli anticorpali sono riportati in Tabella 1. La percentuale di animali sieropositivi si è attestata tra 26.6% e 100%; il coefficiente di variazione (CV%) è stato calcolato sui risultati positivi (0.11-0.85) e sui risultati cumulativi (0.32-0.99) e riportato in Tabella 1. In quattro aziende (B, C, F, G) sono stati riportati segni clinici respiratori in entrambi i cicli analizzati, mentre non sono mai stati segnalati segni clinici nelle aziende A ed E, nonostante una sieroprevalenza tra 33-100%, e durante il primo ciclo nell'azienda D, in cui gli animali erano sieronegativi (Tab. 1). I titoli anticorpali hanno mostrato una tendenza leggermente positiva con l'aumentare dell'età (Fig. 2). Dal punto di vista statistico, non è stato dimostrato un effetto statisticamente significativo della stagionalità sui titoli anticorpali ( $p=0.108$ ), mentre è stato dimostrato un effetto determinato dall'azienda stessa ( $p<0.001$ ) e dall'interazione di azienda e stagionalità ( $p<0.001$ ). Secondo i test post-hoc, i titoli misurati nei due momenti (estate/autunno e inverno/primavera) avevano differenze significative nelle aziende A, B, D, ed E ( $p<0.002$ ), ma non nelle aziende C ( $p=0.07$ ), F ( $p=0.37$ ) e G ( $p=0.09$ ).

Azienda	Data	Età	Segni Clinici	Positività	gmt	Titolo Medio	Titolo Mediano	Min-Max	CV <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup>
A	Settembre 2022	49	ASSENTI	100.0%	21209.3	22410.8	22409.2	9895.8-35004.1	0.32	0.31
	Febbraio 2023	51	ASSENTI	33.3%	1192.6	1764.0	957.0	309.0-6538.0	0.99	0.44
B	Ottobre 2022	43	PRESENTI	100.0%	13883.7	15568.9	15626.0	2394.4-26784.3	0.39	0.39
	Maggio 2023	44	PRESENTI	26.7%	1135.9	1227.4	1129.1	534.0-2240.0	0.39	0.11
C	Agosto 2022	46	PRESENTI	86.7%	3866.1	5745.4	3904.5	639.4-18989.0	0.96	0.85
	Marzo 2023	47	PRESENTI	100.0%	7115.3	8422.9	7417.8	2894.7-16860.7	0.55	0.55
D	Settembre 2022	41	ASSENTI	0.0%	715.6	761.8	655.7	443.5-1325.1	0.37	-
	Marzo 2023	46	PRESENTI	100.0%	7946.9	8902.6	7219.4	2722.8-17449.3	0.46	0.46
E	Ottobre 2022	42	ASSENTI	61.5%	1995.6	2332.2	1945.4	598.6-6549.2	0.63	0.52
	Marzo 2023	44	ASSENTI	93.3%	4898.8	5799.5	4693.4	1525.9-13402.3	0.57	0.53
F	Settembre 2022	45	PRESENTI	100.0%	16704.6	18134.1	19078.8	8287.8-27967.9	0.37	0.37
	Febbraio 2023	49	PRESENTI	100.0%	15037.3	15655.9	13633.7	10082.7-22177.4	0.29	0.29
G	Settembre 2022	42	PRESENTI	100.0%	7024.1	8347.0	7928.6	1684.2-18580.9	0.53	0.53
	Febbraio 2023	61	PRESENTI	100.0%	10321.3	11759.2	11484.6	3893.2-27136.9	0.50	0.50

**Tabella 1.** Riassunto dei titoli anticorpali e dei dati relativi al campionamento e alla sintomatologia. L'età è indicata in giorni; GMT geometric mean titre; CV coefficiente di variazione; CV<sup>a</sup> calcolato su tutti i campioni; CV<sup>b</sup> calcolato sui campioni positivi.



**Figura 2.** Distribuzione dei titoli anticorpali in funzione dell'età, ogni azienda è identificata da un colore e i due punti di campionamento sono rappresentati con forme diverse (cerchio estate/autunno; triangolo inverno/primavera).

## DISCUSSIONE

I problemi respiratori nell'allevamento intensivo sono molto comuni e possono essere causati da vari patogeni, come il virus della bronchite infettiva (IBV), dell'influenza aviaria (AIV), della malattia di Newcastle (NDV), della laringotracheite infettiva (ILTV), *Mycoplasma gallisepticum*, *Riemerella anatipestifer*, *Chlamydophila psittaci*, e *Escherichia coli*. Il ruolo di aMPV nel complesso respiratorio sembra crescere, anche in Italia, dove solo tacchini e animali a lunga vita sono comunemente vaccinati contro aMPV, al contrario dei broiler, e gli allevamenti sono situati in stretta prossimità (Franzo et al., 2020).

In questo studio, tutti i gruppi sono risultati positivi in entrambi i punti di campionamento, tranne in un'azienda, in cui gli animali erano sieronegativi e non hanno mostrato segni clinici al primo campionamento, e positivi al secondo campionamento (azienda D). I segni clinici sono stati riportati in 5 aziende su 7 (71.4%) e in 9 gruppi su 14 (64.3%), nonostante elevate sieroprevalenze anche in gruppi asintomatici. Questo conferma l'ampia circolazione di aMPV in Nord Italia e le differenze tra i gruppi possono essere spiegate dalla natura multifattoriale della malattia, che può essere modulata da altri fattori come management, stress, coinfezioni.

I titoli anticorpali hanno mostrato una tendenza ad aumentare con l'età degli animali, suggerendo l'opportunità di effettuare i campionamenti alla fine del ciclo per massimizzare la rappresentatività diagnostica (Fig. 1-2): solo in due aziende (A, B), ad un'età di campionamento maggiore è stata individuata una percentuale inferiore di animali positivi, forse a causa di un ingresso tardivo del virus, contrariamente a quanto generalmente riportato (30-35 giorni) (Tucciarone et al., 2018) e suggerito dall'elevata sieroprevalenza in animali di oltre i 44 giorni di età negli altri casi. Analogamente, la sieronegatività degli animali nell'azienda D potrebbe essere legata alla precocità del campionamento a 41 giorni. Infatti, l'utilizzo della sierologia come strumento diagnostico deve tenere conto delle tempistiche legate alla sieroconversione e al ciclo produttivo molto breve del pollo da carne (Htut Aung et al., 2008; Rautenschlein et al., 2011; Liman et al., 2007; Mernizi et al., 2023; Park et al., 2011).

Alcuni studi hanno evidenziato una certa stagionalità, con maggiore prevalenza in inverno (Ali et al., 2019) e nella stagione secca (Bakre et al., 2020), contrariamente a questo studio, in cui è stata evidenziata una variabilità più marcata in relazione all'azienda.

aMPV è stato generalmente considerato un problema meno rilevante rispetto ad altri patogeni, nonostante il suo ruolo di patogeno primario e di apriorita ad infezioni secondarie sia acclarato (Umar et al., 2016). In questo contesto epidemiologico e in una regione caratterizzata da una marcata densità di aziende, è necessario valutare la presenza e l'impatto sulla produzione di aMPV, valutando l'opportunità dell'introduzione di scelte manageriali volte al controllo della malattia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ali MZ, Park JE, Shin HJ. (2019). Serological Survey of Avian Metapneumovirus Infection in Chickens in Bangladesh. *J. Appl. Poult. Res.* 28(4): 1330–4.
2. Bayon-Auboyer MH, Arnauld C, Toquin D and N Etteradossi. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.* 81(11): 2723–33.
3. Bakre AA, Oladele OA, Oluwayelu DO and OO Esan. (2020). Serological survey for avian metapneumovirus in commercial chickens from different climatic zones in Nigeria. *J. Vet. Med. Anim. Heal.* 12: 110–5.
4. Canuti M, Kroyer ANK, Ojkic D, Whitney HG, Robertson GJ and AS Lang. (2019). Discovery and characterization of novel RNA viruses in aquatic North American wild birds. *Viruses* 11(9).

5. Catelli E, Cecchinato M, Savage CE, Jones RC and CJ Naylor. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine* 24: 6476–82.
6. Cook JKA, Chesher J, Orthel F, Woods MA, Orbell SJ, Baxendale W and MB Huggins. (2000). Avian pneumovirus infection of laying hens: Experimental studies. *Avian Pathol.* 29(6): 545–56.
7. Franzo G, Tucciarone CM, Moreno A, Legnardi M, Massi P, Tosi G, Trogu T, Ceruti R, Pesente P, Ortali G, Gavazzi L and M Cecchinato. (2020). Phylodynamic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. *Sci. Rep.* 10(1): 1–11.
8. Htut Aung Y, Liman M, Neumann U and S Rautenschlein S. (2008). Reproducibility of swollen sinuses in broilers by experimental infection with avian metapneumovirus subtypes A and B of turkey origin and their comparative pathogenesis. *Avian Pathol.* 37(1): 65–74.
9. Jones RC. (2010). Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? *Br. Poult. Sci.* 51(1): 1–11.
10. Juhasz K and AJ Easton. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: Evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75(11): 2873–80.
11. Kaboudi K and J Lachheb. (2021). Avian metapneumovirus infection in turkeys: a review on turkey rhinotracheitis. *J Appl Poult Res.* 30(4): 100211.
12. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G, and M Cecchinato. (2020). Infectious Bronchitis Virus Evolution, Diagnosis and Control. *Vet. Sci.* 7(2): 79.
13. Liman M and S Rautenschlein. (2007). Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115:273–85.
14. Lupini C, Tucciarone CM, Mescolini G, Quaglia G, Graziosi G, Turblin V, Brown P, Cecchinato M, Legnardi M, Delquigny T, Lemiere S, Perreul G, and E Catelli. (2022). Longitudinal Survey on aMPV Circulation in French Broiler Flocks following Different Vaccination Strategies. *Animals* 13: 57.
15. Luqman M, Duhan N, Temeeyasen G, Selim M, Jangra S and SK Mor. (2024). Geographical Expansion of Avian Metapneumovirus Subtype B: First Detection and Molecular Characterization of Avian Metapneumovirus Subtype B in US Poultry. *Viruses* 16(4): 508.
16. Mernizi A, Bouziane S, Fathi H, Criado JL, Bouslikhane M, Ghram A, Catelli E, Mouahid M and Nassik S. (2023). First seroepidemiological and risk factor survey of avian metapneumovirus circulation in Moroccan broiler farms. *Vet. Glas.* 77(1): 51–68.
17. Mernizi A, Fathi H, Criado J, Bouslikhane M and A Ghram. (2023). Avian Metapneumovirus review: a focus on broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 11(1): 1-17.
18. Naylor C, Shaw K, Britton P, Cavanagh D. (1997). Appearance of type B avian Pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathol.* 26(2):327–38.
19. Park J, Lee D, Shin HJ (2011). Serological survey of antibodies against avian metapneumovirus in Korean chicken flocks. *J. Appl. Poult. Res.* 20(4): 573-576.
20. R Core Team. (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
21. Rautenschlein S, Aung YH and C Haase. (2011). Local and systemic immune responses following infection of broiler-type chickens with avian Metapneumovirus subtypes A and B. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140: 10–22.
22. Retallack H, Clubb S and JL DeRisi. (2019). Genome Sequence of a Divergent Avian

- Metapneumovirus from a Monk Parakeet (*Myiopsitta monachus*). *Microbiol. Resour. Anounc.* 8(16).
23. Saif YM. (2017). Emerging Diseases and Diseases of Complex or Unknown Etiology: Introduction. In: *Diseases of Poultry, 13th Edition*.
  24. Suarez DL, Miller PJ, Koch G, Mundt E and S Rautenschlein. (2020). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. In: *Diseases of Poultry, 14th edition*.
  25. Toquin D, Guionie O, Jestin V, Zwingelstein F, Allee C and N Eterradossi. (2006). European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes* 32: 97–103.
  26. Tucciarone CM, Franzo G, Berto G, Drigo M, Ramon G, Koutoulis KC, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. *Poult. Sci.* 97(1): 303–12.
  27. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Alejo CT, Listorti V, Mescolini G, Brandao PE, Martini M, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97(2): 503–9.
  28. Umar S, Sabir H, Ahmed A, and S Subhan. (2016). Avian metapneumovirus infection in poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 72(4): 833–46.

# REOVIRUS AVIARI ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI BROILER DEL NORD-EST ITALIA NEL 2019-2024, CARATTERISTICHE GENETICHE E CASI CLINICI

Bortolami A.<sup>1</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Zandonà L.<sup>1</sup>, Leardini S.<sup>1</sup>, Castaldello I.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Gavazzi L.<sup>3</sup>, Luisetto P.<sup>4</sup>, Pastori A.<sup>1</sup>, Fusaro A.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Rinaldi E.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>1</sup>, Terregino C.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro, Padova*

<sup>2</sup> *Università di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Viale dell'Università 16, 35020, Legnaro*

<sup>3</sup> *Gesco S.C.A, Cazzago San Martino, Brescia*

<sup>4</sup> *Libero professionista, Resana, Treviso*

## Summary

Avian reoviruses (ARVs), belonging to the *Orthoreovirus* genus within the *Reoviridae* family, are non-enveloped viruses that replicate in the cytoplasm of infected cells. Structurally, the virus is a double-stranded RNA virus composed of ten segments. They are important avian pathogens that can cause considerable economic losses in the poultry industry. Initially identified as causative agents of tenosynovitis in young chickens, avian reoviruses have since been found to be widespread among poultry flocks. However, most of these infections in poultry remain asymptomatic. Avian reoviruses have been associated with a variety of diseases in poultry, including enteric and respiratory diseases, myocarditis, hepatitis, and the so-called stunting/malabsorption syndrome. Despite these associations, a direct link between the presence of the virus and disease manifestation has only been conclusively established for the viral arthritis/tenosynovitis syndrome. This syndrome is characterized by swelling of the hock joints and lesions in the gastrocnemius tendons. Young birds are most susceptible to reovirus infection and subsequent disease but the outcome of the disease in the host following infection also depends on the immune status, the pathogenicity of the virus and the route of exposure, as these viruses are transmitted both horizontally and vertically. Economic losses associated with reovirus infection in young broilers result from increased mortality, viral arthritis/tenosynovitis and lack of uniformity due to uneven growth rates and reduced weight gain. Breeder birds can become infected and may or may not show clinical signs of disease but can vertically transmit the virus to their progeny. There is increasing evidence that current vaccines may not provide sufficient protection under certain epidemiological conditions, as observed in different countries. To control the disease, poultry companies in other countries have opted to use custom inactivated vaccines (autogenous vaccines), with isolates from their flocks to compensate for the lack of protection provided by commercial vaccines. Due to an apparent increase in the number of suspected ARV infections in poultry flocks in the north-eastern part of Italy, a diagnostic workflow allowing detection and characterization by molecular methods was implemented in 2023-2024 to investigate the genetic characteristics of strains isolated from arthritis/tenosynovitis cases. The same approach was used to study the genetic diversity of strains isolated in the Special Virology Laboratory of IZSVE since 2019. Sequencing

results showed a large variation among circulating strains, even considering the limited geographical area investigated. The genotype of ARV isolated from cases where vaccination history was available, differed from the genotype of vaccine strains currently available in Italy. The results of this study highlight the importance of molecular investigations in suspected ARV infections for a more complete understanding of the characteristics of circulating strains and for the development of appropriate control strategies.

## INTRODUZIONE

I reovirus aviari (ARVs), appartenenti al genere *Orthoreovirus* della famiglia dei *Reoviridae*, sono virus privi di *envelope* che replicano nel citoplasma delle cellule infette. Strutturalmente, si tratta di virus a RNA a doppio filamento composto da dieci segmenti. Furono identificati inizialmente come agenti causali di forme di tenosinovite in broiler verso la fine degli anni '50 negli Stati Uniti (Olson, 1978). In seguito, si scoprirono essere agenti virali estremamente diffusi nel settore avicolo con la maggior parte delle infezioni che rimangono in forma asintomatica. Si stima che circa l'85-90% dei ceppi di ARV sia apatogeno, tuttavia, sono stati associati a diversi quadri morbosi nel pollame, tra cui malattie enteriche e respiratorie, miocarditi, epatiti e la cosiddetta *stunting/malabsorption syndrome* (Van der Heide, 2000). È stato possibile stabilire una connessione diretta tra la presenza di ARV e forma clinica per quanto riguarda la sindrome dell'artrite virale, meglio nota anche come tenosinovite. Questa sindrome è caratterizzata da gonfiore delle articolazioni del garretto e lesioni nei tendini del gastrocnemio. In genere gli animali giovani sono più suscettibili all'infezione e alla malattia conseguente; tuttavia, l'esito della malattia dipende anche dallo stato immunitario, dalla patogenicità del virus e dalla via di esposizione, poiché questi virus vengono trasmessi sia orizzontalmente che verticalmente. Le perdite economiche associate all'infezione da reovirus nei broiler sono dovute all'aumento della mortalità, alla forma clinica di artrite e alla mancanza di uniformità dei gruppi causata da tassi di crescita irregolari e alla riduzione dell'incremento ponderale. Per la diffusione della malattia assume particolare rilevanza la possibile trasmissione verticale da parte di riproduttori infetti asintomatici. Le strategie di controllo della malattia vertono principalmente sull'uso di vaccini vivi attenuati o spenti basati sui ceppi S1133, 1733 e 2408, che si sono dimostrati efficaci per diversi anni. Vi sono tuttavia crescenti evidenze che i vaccini attuali potrebbero non fornire una protezione sufficiente in determinate condizioni epidemiologiche e di allevamento. In queste condizioni, per controllare la malattia, molte aziende avicole fanno ricorso a vaccini autogeni per compensare la mancanza di protezione offerta dai vaccini commerciali (De Carli et al., 2020). In Italia, la presenza di ARV negli allevamenti è ben nota e le forme cliniche vengono in gran parte mantenute sotto controllo tramite l'uso della vaccinazione anche se attualmente non sono disponibili informazioni precise e dati sistematici sulle caratteristiche dei ceppi circolanti o sulla frequenza delle forme cliniche causate da ARV. A seguito di un apparente aumento di casi di tenosinoviti in allevamenti di broiler da carne, il laboratorio di virologia dell'IZSVe ha messo a punto delle metodiche molecolari per l'identificazione rapida e la caratterizzazione di ARV da casi clinici sospetti al fine di comprendere meglio se fossero attribuibili a specifici genotipi e valutare la distanza genetica tra questi virus e i ceppi presenti nei vaccini commerciali disponibili.

## **MATERIALI E METODI**

### *Raccolta dati clinici e diagnostici*

Dati relativi alla presentazione clinica, lesioni anatomopatologiche e risultati delle indagini diagnostiche per i casi analizzati sono stati raccolti dalle Sezioni territoriali di Verona e Treviso dell'IZSve.

### *Isolamento virale*

I campioni clinici (Tabella 1) sono stati omogenati utilizzando mortaio e pestello sterili in PBS addizionati di antibiotici (penicillina e streptomina, 10% v/v). Il surnatante dell'omogenato è stato chiarificato mediante centrifugazione e utilizzato per infettare cellule primarie di pollo SPF (*chicken embryo liver*, CEL). Le colture cellulari sono state incubate a 37 °C (con 5% di CO<sub>2</sub>) per 5 giorni e monitorate quotidianamente per la presenza di effetti citopatici. In caso di presenza di effetto citopatico riferibile ad infezione con ARV, il surnatante della coltura cellulare è stato raccolto e la presenza di ARV è stata confermata tramite TEM e RT-PCR.

### *Analisi molecolari*

L'estrazione automatizzata degli acidi nucleici dai surnatanti cellulari è stata effettuata con lo strumento QIASymphony SP utilizzando il kit QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit Nucleic acid extraction seguendo le istruzioni del produttore.

Per la RT-PCR è stato ottimizzato il protocollo messo a punto da Kant et al. (2003) utilizzando i primer (P2 (Fw) 5'-AGTATTTGTGAGTACGATTG-3' e P4 (Rev) 5'-GGCGCCACCTTAGGT-3') per l'amplificazione di una porzione di 912 paia di basi del gene sigma C gene situato sul segmento S1. Per la reazione di amplificazione è stato utilizzato il kit one-step RT-PCR kit della QIAGEN. Gli stessi oligonucleotide sono stati utilizzati per il sequenziamento utilizzando il kit Big-Dye cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems) e un sequenziatore automatico ABI 3100. La denominazione dei Cluster di appartenenza è stata uniformata a quella descritta da Kovács et al., 2023 (2023).

## **RISULTATI**

### *Caratteristiche genetiche di ceppi di ARV isolati*

In Tabella 1 sono riassunti i dati relativi ai campioni risultati positivi all'isolamento virale e il cluster genetico di appartenenza. In breve, è stato possibile ottenere una sequenza parziale del gene sigma C per 14 ceppi di ARV isolati da gruppi di broiler da ingrasso. Le analisi effettuate hanno permesso di rilevare una grande variabilità tra i ceppi di ARV circolanti nel territorio del Nord-Est Italia, con la presenza, in un arco temporale ristretto (2019-2024), di isolati appartenenti a tutti i cluster genetici descritti (I-V). Ceppi appartenenti ai cluster II e IV appaiono essere più frequentemente coinvolti in forme cliniche di artrite/tenosinovite e maggiormente presenti nel territorio analizzato. La grande variabilità si dimostra anche tra isolati appartenenti allo stesso cluster, con rare eccezioni per le quali data l'elevata similarità genetica, è stato possibile stabilire un link epidemiologico tra i focolai.

<b>Id Campione</b>	<b>Anno</b>	<b>Età (gg)</b>	<b>Indirizzo produttivo</b>	<b>Tessuto</b>	<b>Diagnosi</b>	<b>Cluster</b>
19VIR45	2019	7	Broiler - ingrasso	Intestino	Enterite	II
20VIR3223	2020	25	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	I
20VIR3325	2020	31	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	IV
21VIR9641	2021	15	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	IV
22VIR2983	2022	14	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	II
22VIR8092	2022	7	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	IV
22VIR7493	2022	20	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	IV
23VIR4119	2023	25	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite, enterite, polmonite	II
23VIR4207	2023	19	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite, enterite, nefrosi	II
23VIR4597	2023	18	Broiler - ingrasso	Intestino	Enterite	V
23VIR5961	2023	55	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	IV
23VIR6995	2023	17	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	I
24VIR727	2024	10	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	II
24VIR810	2024	21	Broiler - ingrasso	Tendini	Artrite/tenosinovite	III

**Tabella 1.** Riassunto dei dati clinici, diagnostici e genetici relativi ai ceppi di ARV isolati.

#### *Case series 1*

Riscontrata una serie di casi di artrite/tenosinovite in allevamenti di broiler complicati da un quadro di enterite con ritardo di crescita, tutti provenienti dallo stesso gruppo di riproduttori. In 3 allevamenti è stato possibile isolare ARV dai campioni di tendine raccolti in sede necroscopica, isolamento confermato tramite ME e RT-PCR. Nei due casi in cui è stato possibile ottenere una sequenza (23VIR4119, 23VIR4207) si è potuta osservare un'altissima omologia (99.97% a livello nucleotidico) per la porzione sequenziata del gene Sigma C.

#### *Case series 2*

Riscontrati due casi di artrite/tenosinovite (23VIR5961 e 24VIR727) in allevamenti di broiler (Ross 308) provenienti dallo stesso incubatoio. Nel primo caso sono stati analizzati campioni prelevati da animali arrivati al macello, mentre nel secondo caso la patologia si è presentata in fase molto precoce, a circa 10 giorni di età. In entrambi i casi a fine ciclo si è potuto riscontrare un grave ritardo nell'accrescimento e un incremento di mortalità. In questi casi, nonostante la connessione epidemiologica, le analisi genetiche hanno evidenziato l'appartenenza a due diversi cluster genetici (IV e II, rispettivamente).

## **DISCUSSIONE**

Negli ultimi anni si sono susseguiti con sempre maggiore frequenza report in diversi paesi europei ed extra-europei che hanno confermato l'associazione tra ARV e forme di artrite/tenosinovite. Ceppi di ARV non appartenenti ai genotipi vaccinali sono stati rilevati in polli con tenosinovite e sindrome da malassorbimento in allevamenti di pollame commerciali in tutto il mondo, anche in allevamenti vaccinati. L'incompleta cross-protezione offerta dai vaccini e la maggiore diffusione del virus sono state identificate come possibili cause per l'aumento dei focolai riportati (Franzo et al., 2024). In diversi paesi è stata riscontrata un'elevata variabilità di genotipi circolanti, ma ad oggi non sono disponibili informazioni esaurienti relative alla situazione epidemiologica italiana. Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di mettere a punto metodiche adatte ad indagare le caratteristiche genetiche dei ceppi di ARV e di valutare l'applicabilità di metodiche di caratterizzazione molecolare per l'identificazione di connessioni epidemiologiche e potenziali vie di trasmissione in allevamenti di broiler colpiti da forme di tenosinovite virale. I risultati ottenuti hanno permesso di individuare un'elevata variabilità dei ceppi circolanti, seppur con una maggiore prevalenza di isolati appartenenti ai cluster genetici II e IV. La variabilità osservata si riflette anche nella divergenza a livello di proteina Sigma C dei ceppi circolanti da quelli vaccinali (53-58% di omologia a livello di sequenza amminoacidica nel tratto analizzato), dato che potrebbe supportare la incompleta tenuta vaccinale. Tale variabilità, non completamente inattesa, stupisce tuttavia considerata la dimensione ristretta dell'area geografica di provenienza degli isolati e il breve arco temporale in cui sono stati raccolti. Nelle due serie di casi analizzati l'apparente connessione epidemiologica identificata su base anamnestica ha portato a differenti conclusioni sulla possibile fonte di introduzione. Nella prima serie di casi descritti, nella quale in alcuni gruppi di broiler accomunati dalla discendenza da un singolo gruppo di riproduttori si sono riscontrati ritardi nell'accrescimento, tenosinoviti ed enteriti, gli ARV isolati hanno mostrato una elevatissima similitudine suggerendo una probabile fonte comune dell'infezione. Considerate le caratteristiche di trasmissione di ARV, che includono la via verticale, e la possibile infezione anche in gruppi vaccinati, il gruppo di riproduttori è stato sostituito portando a una cessazione dei casi. Nella seconda serie di casi la connessione epidemiologica era fornita dal comune incubatoio di provenienza mentre i riproduttori appartenevano a gruppi successivi. Gli ARV isolati da tendini prelevati in questi casi di tenosinovite hanno mostrato l'appartenenza a due diversi genotipi (II e IV), dato che fa maggiormente propendere per introduzioni distinte per trasmissione orizzontale, non correlate all'incubatoio di provenienza.

## **CONCLUSIONI**

La messa a punto di metodi di caratterizzazione molecolare associati ad indagini genetiche ha permesso di evidenziare la complessa situazione epidemiologica di ARV nel territorio italiano e sottolinea l'importanza di approfondire casi sospetti di ARV al fine di migliorare la comprensione delle caratteristiche dei virus circolanti e delle vie di diffusione per migliorare l'efficacia delle strategie di controllo della malattia.

## BIBLIOGRAFIA

1. De Carli S, Wolf JM, Gräf T, Lehmann FKM, Fonseca ASK, Canal CW and N Ikuta. (2020). Genotypic characterization and molecular evolution of avian reovirus in poultry flocks from Brazil. *Avian Pathol.* 49(6): 611–620.
2. Franzo G, Tucciarone CM, Faustini G, Poletto F, Baston R, Cecchinato M and M Legnardi. (2024). Reconstruction of Avian Reovirus History and Dispersal Patterns: A Phylodynamic Study. *Viruses* 16(5): 796.
3. Kant A, Balk F, Born L, van Roozelaar D, Heijmans J, Gielkens A and A ter Huurne. (2003). Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. *Veterinary Research* 34(2): 203-212.
4. Kovács E, Varga-Kugler R, Mató T, Homonnay Z, Tatár-Kis T, Farkas S, Kiss I, Bányai K and V Palya. (2023). Identification of the main genetic clusters of avian reoviruses from a global strain collection. *Front. Vet. Sci.* 9: 1094761.
5. Olson, N.O., 1978. In: Hofstad, M.S. (Ed.), *Diseases of Poultry*, Ames, Iowa.
6. Van der Heide L. (2000). The history of avian reovirus. *Avian Diseases* 44(3): 638-641.

# IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPI RIASSORTANTI DELL'EUROPA NORDOCCIDENTALE (GENOTIPO A3B1) IN ITALIA

Poletto F.<sup>1</sup>, Tonellato F.R.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Broggi M.<sup>2</sup>, Pirota M.<sup>2</sup>, Falappa S.<sup>2</sup>, Ceroni S.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Veterinario settore avicolo*

## Summary

Infectious bursal disease (IBD), also known as Gumboro disease, is a highly contagious viral disease affecting young chickens with a significant economic impact on the poultry industry. Its aetiological agent, infectious bursal disease virus (IBDV), is a non-enveloped virus whose main target is represented by maturing B cells within the bursa of Fabricius. Consequently, besides manifesting with acute forms characterized by non-specific clinical signs and variable mortality rates, IBD causes immunosuppression, making chickens vulnerable to secondary infections, performance reduction, and vaccine failures.

Two IBDV serotypes, named 1 and 2, have been recognized, but only the former is pathogenic. Serotype 1 strains are traditionally divided into classical, variant, and very virulent subgroups, but this distinction leaves out many other IBDV types which emerged over time due to the high mutation rate of IBDV along with reassortment of its two genome segments. Such variability has serious practical implications, hindering diagnostic efforts and vaccine efficacy. Recently proposed methods relying on phylogeny and focusing on the genes coding for VP2 and VP1, the two viral proteins with the most impact on phenotype, enabled a better understanding of IBDV epidemiology.

In the present study, the use of this phylogenetic approach allowed for the first detection of Northwestern European reassortant strains (genotype A3B1) in Italy. Until recently, the Italian IBDV scenario stood aside from neighboring countries, as all the reported IBDVs were A3B1 strains belonging to a separate clade which was only also found in Russia, Kazakhstan, and the Middle East. On the other hand, Northwestern European reassortants, which are associated with subclinical infections and severe immunosuppression, were the predominant IBDV type in most of the continent despite a recent emergence. Starting from the end of 2023, such reassortants started accounting for a significant part of the detected field strains in Italy, although the Italian-Russian-Middle Eastern A3B1 clade is still present. Albeit preliminary, this timely report of the introduction of a novel IBDV type will hopefully help raising the awareness towards current field challenges and prompt an attentive monitoring of the potential epidemiological shift which might be occurring nationally.

## INTRODUZIONE

La bursite infettiva (IBD), conosciuta anche come malattia di Gumboro, è una malattia virale altamente contagiosa che colpisce i polli, in particolare soggetti giova-

ni tra le 2 e le 6 settimane di età, con un impatto economico significativo sull'industria avicola mondiale. La borsa di Fabrizio, organo linfoide primario in cui avviene lo sviluppo e maturazione dei linfociti B, è il principale bersaglio dell'agente eziologico della malattia, noto come virus della bursite infettiva (IBDV) (Etteradossi e Saif, 2019). In corso di IBD acuta, si osservano sintomi aspecifici come depressione, penne arruffate, anoressia, disidratazione e lesioni emorragiche evidenti nei muscoli delle cosce e del petto, oltre a un tasso di mortalità variabile. La principale conseguenza della malattia è però l'immunosoppressione, che espone gli animali a infezioni secondarie, peggioramento delle performance produttive, e riduzione dell'efficacia delle vaccinazioni.

IBDV appartiene alla specie *Avibirnavirus gumboroense*, genere *Avibirnavirus*, famiglia *Birnaviridae*, e possiede un genoma a RNA a doppio filamento composto da due segmenti, denominati A e B. Il segmento A codifica varie proteine, tra cui la proteina capsidica (VP2), la proteina scaffold (VP3), la proteasi (VP4) e una proteina non strutturale (VP5), mentre il segmento B codifica la RNA polimerasi RNA-dipendente (VP1) (Zhang et al., 2022). IBDV può essere classificato in due sierotipi: il sierotipo 1 è patogeno, mentre il sierotipo 2 no. I ceppi del sierotipo 1 vengono tradizionalmente classificati in tre sottogruppi: i ceppi classici, descritti per la prima volta negli anni '60 (Cosgrove, 1962) e associati a sintomi e lesioni tipici; i ceppi varianti, che presentano notevoli differenze antigeniche e sono principalmente associati a infezioni subcliniche; e i ceppi *very virulent*, i quali, pur essendo antigenicamente simili ai ceppi classici, sono responsabili di focolai più gravi e di una mortalità più elevata (Etteradossi e Saif, 2019). Come altri virus a RNA, la deriva antigenica e l'alto tasso mutazionale comportano sfide significative nella prevenzione e nel controllo della circolazione di IBDV (Zhang et al., 2022), ulteriormente complicati dalla possibilità di riassortimento tra i segmenti genomici. Nel corso del tempo, tali fenomeni evolutivi hanno portato all'emergere di numerosi sottotipi virali, la cui eterogeneità non è adeguatamente catturabile utilizzando la classificazione tradizionale.

Recentemente, la proposta di sistemi di classificazione basati sulla filogenesi ha contribuito ad una descrizione più accurata dell'epidemiologia di IBDV. Tra i metodi attualmente a disposizione, quello proposto da Islam et al. (2021) pone attenzione sui geni codificanti per VP2 e VP1, sulla base dei quali vengono riconosciuti rispettivamente dieci (A0-A9) e cinque (B1-B5) genogruppi, i quali, qualora considerati assieme, originano una classificazione composita in genotipi (es. A1B1, A1B2, A2B1, ecc.). L'attenzione posta nei confronti di VP2 e VP1 è motivata dalla loro rilevanza funzionale: VP2 ha un ruolo ben consolidato nella determinazione dell'antigenicità (Letzel et al., 2007), mentre sia VP2 che VP1 sono noti per contribuire alla determinazione della patogenicità (Escaffre et al., 2013). Essendo localizzati su segmenti diversi, considerare entrambi i geni consente anche di rilevare eventi di riassortimento (Mató et al., 2020; He et al., 2016).

La finalità del presente lavoro è segnalare l'identificazione, resa possibile dall'applicazione di un tale approccio filogenetico, di una tipologia di ceppi di IBDV definiti riassortanti dell'Europa nordoccidentale (genotipo A3B1), finora mai segnalati in Italia. A seguito della loro scoperta, sono state condotte ulteriori indagini per una caratterizzazione molecolare più dettagliata.

## MATERIALI E METODI

Il presente studio riporta i risultati di analisi biomolecolari condotte su campioni prelevati in allevamenti di broiler italiani ed eseguite nell'ambito delle attività di ricerca svolte presso il Laboratorio di Biotecnologie e Malattie Infettive del Dipartimento MAPS dell'Università degli Studi di Padova (Legnaro, Italia). Ognuno dei campioni considerati consisteva in quattro impronte bursali su FTA™ card (GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK) ed era stato prelevato da gruppi di animali che differivano per il protocollo vaccinale applicato e per età al momento del campionamento. Il processo di trattamento di ciascun campione ha comportato l'eluizione in 1,0 ml di PBS 1× di 4 frammenti da 5 mm<sup>2</sup>, uno per ogni borsa impressa sulla medesima FTA™ card. Gli acidi nucleici sono stati estratti utilizzando il kit High Pure Nucleic Acids Extraction (Roche™, Basilea, Svizzera) seguendo le istruzioni del produttore. L'indagine molecolare dei geni VP2 e VP1 è stata effettuata eseguendo una RT-PCR one-step con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, Waltham, MA, USA) utilizzando i primer 743-1 (5'-GCCCAGAGTCTACACCAT-3') e 743-2 (5'-CCCGGATTAT GTCTTTGA-3') (Jackwood e Sommer-Wagner, 2005) per sequenziare la regione ipervariabile del gene VP2 e i primer B-Univ-F (5'-AAT-GAGGAGTATGA GACCGA-3') (Islam et al., 2012) e VP1-shortR (5'-TGGAA-ACAAAAGCCCGCATG-3') (Legnardi et al., 2024a) per la porzione della VP1. I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger utilizzando sia i primer forward che quelli reverse impiegati nella rispettiva RT-PCR. Il sequenziamento è stato eseguito presso MacroGen Europe Milan Genome Center (Milano, Italia). I cromatogrammi sono stati poi controllati e trimmati utilizzando il software Finch TV (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA), e assemblati con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD, Australia). Le analisi filogenetiche sono state successivamente svolte in MEGAX (Kumar et al., 2018), allineando le sequenze ottenute ad appositi dataset di referenza e costruendo i relativi alberi tramite approcci di Maximum Likelihood.

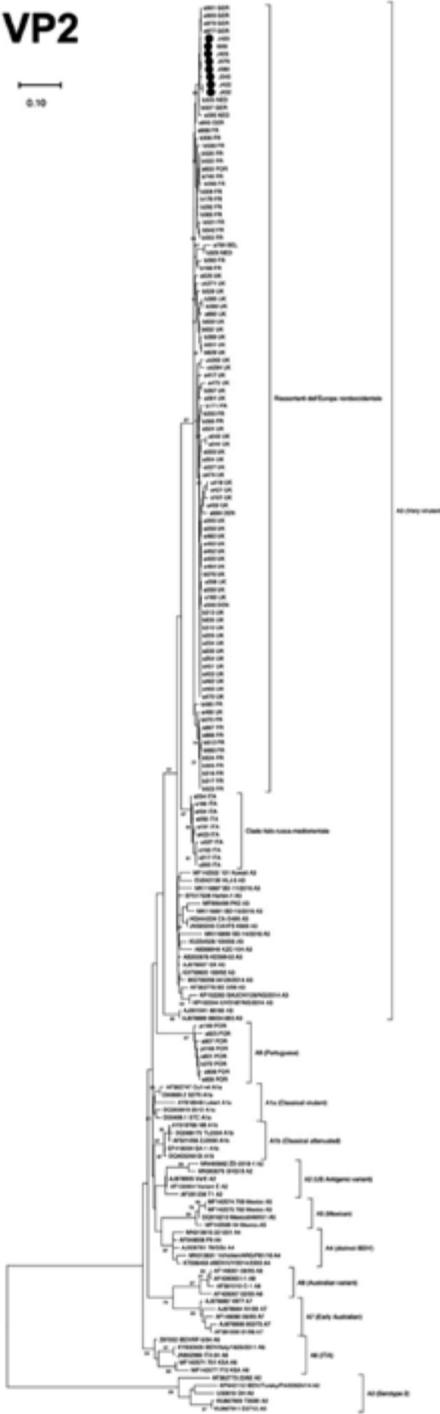
## RISULTATI

Le analisi molecolari per la ricerca di IBDV hanno evidenziato delle positività a ceppi A3B1 geneticamente differenti da quelli segnalati sul territorio italiano sino a quel momento, sollecitando un'investigazione più approfondita. I ceppi in questione sono stati identificati in nove campioni prelevati tra il dicembre 2023 e il marzo 2024 in otto allevamenti di broiler (uno dei quali campionato durante due cicli differenti) localizzati in Veneto ed Emilia-Romagna.

L'identità genetica reciproca si è rivelata elevata sia a livello di VP2 (98.9-100%) che di VP1 (99.5-100%), e i nove ceppi sono stati classificati come riassortanti dell'Europa Nordoccidentale, secondo la definizione di Mató et al. (2020). Rispetto alla medesima tipologia di riassortanti identificati in diversi paesi europei nell'ambito di un precedente studio epidemiologico (Legnardi et al., 2023a), a livello di VP2 le sequenze ottenute sono ricadute all'interno di un cluster composto di ceppi tedeschi e olandesi, molti dei quali, assieme ad un singolo stipite francese e ad uno identificato nel Regno Unito, risultavano filogeneticamente vicine anche sulla base della VP1 (Figura 1).

# VP2

0.10



# VP1

0.050



**Figura 1.** Alberi illustranti le relazioni filogenetiche tra i ceppi sequenziati nel presente studio (contrassegnati dal simbolo ●) e un database contenente sequenze di riferimento per ognuno dei genogruppi identificati da Islam et al. (2021) e le sequenze ottenute durante un precedente studio svolto a livello europeo (Legnardi et al., 2023a). I modelli di sostituzione K2+G e K2+G+I, selezionati sulla base del *Bayesian information criterion* (BIC), sono stati utilizzati rispettivamente per l'albero basato sulla VP2 e sulla VP1, settando in entrambi i casi il numero di repliche *bootstrap* a 1000. I valori di supporto nodale sono stati riportati solo se uguali o superiori a 70.

## DISCUSSIONE

I risultati qui presentati rappresentano la prima evidenza nota della circolazione di riassortanti dell'Europa nordoccidentale sul territorio italiano. Ciò rappresenta una novità epidemiologica rilevante ma non inattesa, se si considera come tali ceppi, descritti per la prima volta nel 2017, risultino presenti – e spesso predominanti – in gran parte dell'Europa (Legnardi et al., 2023a, 2023b; Mató et al., 2022; Piķuła et al., 2023). I motivi di una diffusione tanto veloce non sono ancora del tutto chiari, ma essi sono stati associati sia sperimentalmente che in campo a infezioni subcliniche, difficili da diagnosticare dal punto di vista clinico, sebbene il loro acclarato potenziale immunosoppressivo imponga la massima attenzione (Mató et al., 2020). In anni recenti, l'Italia ha rappresentato un'eccezione rispetto al resto d'Europa, in quanto interessata dalla circolazione di una clade di ceppi A3B1 separata, e ritrovata solo in paesi come Russia, Kazakistan, Giordania, Iraq, Iran e Libano (Legnardi et al., 2024a; Michel e Jackwood, 2017). Sulla base di studi epidemiologici precedenti (in cui però non era stato preso in considerazione il gene della VP1) è stato ipotizzato che questi ceppi siano presenti a livello nazionale da più di 10 anni (Legnardi et al., 2023a), ma la loro esatta patogenicità non è tuttora nota.

Sebbene la clade italo-russa-medorientale del genotipo A3B1 venga ancora identificata, a partire dal dicembre 2023 i riassortanti dell'Europa Nordoccidentale hanno rappresentato una porzione significativa dei ceppi di campo caratterizzati. L'esecuzione di continue attività di ricerca anche prima di questa data suggerisce che la loro introduzione sul territorio italiano sia stata diagnosticata tempestivamente, ma ciononostante tali riassortanti sono già stati ritrovati nelle aree caratterizzate dalla più alta densità di attività avicole. La loro capacità di divenire rapidamente predominanti a seguito dell'ingresso in un nuovo contesto geografico e produttivo, documentata da un analogo studio svolto in Portogallo (Legnardi et al., 2024b), suggerisce che una diffusione simile a quella osservata in altre parti d'Europa avverrà anche in Italia, anche a scapito dei ceppi di campo già circolanti.

## CONCLUSIONI

Per quanto preliminari e basate su una numerosità campionaria limitata, le evidenze descritte nel presente studio risultano di grande rilevanza per il contesto avicolo italiano. La grande capacità di diffusione dimostrata dai riassortanti dell'Europa Nordoccidentale e le significative implicazioni in termini diagnostici, di controllo e di impatto economico e sanitario impongono l'esecuzione di adeguate attività di monitoraggio, con una particolare attenzione a come l'introduzione di una nuova tipologia di ceppi di campo modificherà lo scenario epidemiologico nazionale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cosgrove AS. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, 6: 385.
2. Escaffre O, Le Nouën 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. *Journal of Virology*, 87(5): 2767-2780.
3. Etteradossi N and YM Saif. (2019). Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (Eds.), *Diseases of Poultry*, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, pp. 257–283.
4. 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 Pathology*, 45(2): 178–186.
5. Islam MR, Rahman S, Noor M, Chowdhury EH and H Müller. (2012). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Archives of virology*, 157: 333-336.
6. 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 Pathology*, 50(2): 190-206.
7. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2005). Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emerging Viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49(2): 220–226.
8. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
9. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K and M Cecchinato. (2023a). Infectious bursal disease virus in Western Europe: The rise of reassortant strains as the dominant field threat. *Avian Pathology*, 52(1): 25-35.
10. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Poletto F, Dauphin G, Le Tallec B, Lopes M-A, Koutoulis K and M Cecchinato. (2023b). Update on the molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in Western Europe in 2021-2022. In: XXII Congress of the WVPA – Book of Abstracts. Verona, Italia, 4-8 Settembre 2023. P. 121.
11. Legnardi M, Poletto F, Alam S, Cherfane A, Le-Tallec B, Franzo G, Tucciarone CM, Lupini C, Pasotto D and M Cecchinato. (2024a). Molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in the Near East and Persian Gulf regions. *Avian Pathology*, 53(1): 56–67.
12. Legnardi M, Duarte I, Silva MC, Poletto F, Tucciarone CM, Koutoulis K and M Cecchinato. (2024b). Epidemiology of infectious bursal disease virus in Portugal: replacement of local strains by Northwestern European reassortants as dominant field type. In: XVI European Poultry Conference of the WPSA – Book of Abstracts. Valencia, Spagna, 24-28 Giugno 2024. P. 426.
13. Letzel T, Coulibaly F, Rey FA, Delmas B, Jagt E, van Loon AAMW and E Mundt. (2007). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 81(23): 12827–12835.

14. 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. *Veterinary Microbiology*, 245: 108663.
15. Mató T, Medveczki A and I Kiss. (2022). Research Note: “Hidden” infectious bursal disease virus infections in Central Europe. *Poultry Science*, 101(8): 101958.
16. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Archives of Virology*, 162: 3661-3670.
17. Pikuła A, Lisowska A and K Domańska-Blicharz. (2023). Epidemiology of infectious bursal disease virus in Poland during 2016–2022. *Viruses*, 15(2): 289.
18. Zhang W, Wang X, Gao Y and X Qi. (2022). The Over-40-Years-Epidemic of Infectious Bursal Disease Virus in China. *Viruses*, 14: 2253.

# VACCINAZIONE PER LA BURSITE INFETTIVA AVIARE NEL POLLO DA CARNE: APPLICABILITÀ DEI VACCINI VIVI ATTENUATI AL PRIMO GIORNO DI VITA PER VIA SOTTOCUTANEA

Lupini C.<sup>1</sup>, Pedrazzoli S.<sup>1</sup>, Lizzi G.<sup>1</sup>, Quaglia G.<sup>1</sup>, Graziosi G.<sup>1</sup>, Salaroli R.<sup>1</sup>, Russo E.<sup>2</sup>, Gentile N.<sup>1</sup>, Longoni C.<sup>2</sup>, Anfossi P.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *MSD Animal Health Srl, Palazzo Canova, 20054 Segrate, MI, Italia;*

<sup>3</sup> *Vetspin Srl, via Toscanini, 9 40055, Villanova di Castenaso, BO, Italia*

## Summary

Administration of live attenuated vaccines in the hatchery would be of great interest for biosecurity and economical point of view but its suitability has been poorly investigated. In the present study broilers with IBDV maternally derived antibodies were vaccinated by subcutaneous route at day-old with Nobilis® Gumboro D78 or Nobilis® Gumboro 228E live vaccines or an immune complex vaccine, then challenged with a very virulent IBDV at different time points, in order to evaluate the efficacy of the vaccination protocols and their impact on the immune response to other vaccines commonly used in the field. At day of hatch 384 birds were divided in groups and IBD vaccinated with Nobilis Gumboro® D78 vaccine strain (group A), Nobilis Gumboro® 228E vaccine strain (group B), an immune complex vaccine (group C) or remained unvaccinated (group D). Groups A, B and C, were also vaccinated subcutaneously for Infectious Laryngotracheitis (ILT) and Marek disease with the live modified strain HVT+ILT-138 and by eye-drop for Infectious bronchitis (IB) with strains Ma5 and 4/91. At days 7, 14, 21 and 28 post-vaccination, 10 birds per group were bled to determine IBD, IB and ILT antibody titres by ELISA tests. At 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 or 28 days after the vaccination, six to ten birds per group were moved to secure isolation conditions in poultry isolators and challenged with IBD very virulent CS89 strain. A group of unvaccinated birds remained unchallenged and kept as negative control. Challenged birds were monitored for clinical signs or mortality for 5 days, then euthanized. Carcasses and bursa of Fabricius were weighted for the calculation of bursa/body weight ratio. Next generation sequencing (NGS) analysis to detect challenge- or vaccines viruses, histopathology and flow cytometry for the determination of immune cells populations (leucocytes CD45+, B cells Bu1+ and T cells CD3+) were also performed on bursa samples. Data were statistically analysed using R version 3.5.1 software. From 14 to 28 days of age, ILT and IB antibodies increased in all groups, unless in the unvaccinated one; statistically higher titers of ILT and IB antibodies were observed in Nobilis Gumboro® 228E vaccinated group at 28 days of age. After challenge, no clinical signs nor mortality nor macro- or microscopic lesions referable to IBD, were observed in vaccinated groups, while group D showed IBD related macro- and microscopic lesions in the bursa at 33 days of age. Compared to Nobilis® D78 vaccine, lower bursa/body weight ratios were recorded in Nobilis® 228E and in the immunocomplex vaccinated chickens, aged 28 days or older. NGS analysis showed that the bursae

replication of the Nobilis® 228E and the immunocomplex vaccines was higher than the Nobilis® D78 vaccine, where challenge virus was widely detected. Flow cytometry analysis has shown an increased T cells population (CD3+) in all groups at 33 days of age and only in Nobilis® 228E vaccinated group also at 22-26 days of age. In conclusion, our results show that live vaccines Nobilis® 228E or Nobilis® D78 administered subcutaneously at day-old protect chickens from bursa lesions due to virulent challenge up to 28 days of age and do not affect the humoral immune response to ILT and IBV vaccines. Moreover, Nobilis® 228E vaccination prevents the bursa colonization by the challenge virus analogously to the immune-complex vaccine, suggesting that it could reduce virulent virus circulation in field condition.

## **INTRODUZIONE**

La protezione precoce nei confronti del virus della Bursite Infettiva Aviaria (IBDV) risulta di fondamentale importanza. Questa solitamente è ottenuta mediante immunizzazione attiva, *in ovo* o al primo giorno di vita, con vaccini ricombinanti o a immunocomplessi, o, a 15-20 giorni di vita, di vaccini vivi attenuati (Muller et al., 2012) di animali dotati di anticorpi materni nei riguardi di IBDV. Scarsamente studiata è stata l'applicabilità dei vaccini vivi attenuati in incubatoio al primo giorno di vita, sebbene tale impiego risulterebbe di grande interesse sia per motivi economici che di biosicurezza.

Nel presente studio gruppi di broiler, con anticorpi materni per IBDV, sono stati vaccinati al primo giorno di vita per via sottocutanea con i vaccini vivi attenuati Nobilis® Gumboro D78 o Nobilis® Gumboro 228E, o un vaccino a immunocomplessi. Successivamente gli animali sono stati infettati sperimentalmente con un ceppo *very virulent* di IBDV a diversi giorni post-vaccinazione, al fine di valutare l'efficacia dei diversi protocolli vaccinali e il loro impatto sulla risposta immunitaria conferita da altri vaccini comunemente impiegati in campo.

## **MATERIALI E METODI**

Al primo giorno di vita 384 broiler sono stati suddivisi in gruppi e vaccinati per via sottocutanea per IBDV alternativamente con i seguenti vaccini vivi: Nobilis Gumboro® D78 (gruppo A), Nobilis Gumboro® 228E (gruppo B), a immunocomplessi (gruppo C); un gruppo di animali è rimasto non vaccinato e tenuto come controllo (gruppo D). Gli animali dei gruppi A, B e C sono stati inoltre vaccinati, con il ceppo modificato HVT+ILT-138 per la Laringotracheite Infettiva (ILT) e la Malattia di Marek (via sottocutanea) e per Bronchite Infettiva (IB) con i ceppi Ma5 e 4/91 (goccia oculare).

Ai giorni post-vaccinazione 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 o 28, 6-10 animali per gruppo (A, B, C e D/CH) sono stati allocati in isolatori per pollame e sottoposti ad infezione di prova con il ceppo IBDV *very virulent* CS89. Un gruppo di animali non vaccinati non è stato sottoposto ad infezione di prova e tenuto come controllo negativo (gruppo D/UN).

Gli animali sono stati osservati quotidianamente per verificare eventuale comparsa di sintomatologia o mortalità, e soppressi 5 giorni post-infezione. Dopo esame necroscopico, carcassa e borsa di Fabrizio sono state pesate per il calcolo del rapporto peso borsa/peso corporeo (Sharma et al., 1989). Dalla borsa di Fabrizio

di ciascun soggetto, sono state eseguite le seguenti analisi: Next generation sequencing (NGS), per differenziare i vaccini e il ceppo IBDV *very virulent* CS89 inoculato; istopatologia per quantificare le lesioni microscopiche (Sharma et al., 1989); citometria di flusso per quantificare le popolazioni di cellule immunitarie presenti (leucociti CD45+, linfociti B Bu1+ e linfociti T CD3+) (Lupini et al., 2020). I dati ottenuti sono stati analizzati con il software R version 3.5.1.

Ai giorni post-vaccinazione 7, 14, 21 e 28, su 10 animali per gruppo non sottoposti ad infezione di prova, è stato eseguito il prelievo di sangue per determinare i titoli anticorpali nei riguardi di IBDV, IBV e ILTV mediante test ELISA.

Lo studio sperimentale è stato eseguito in conformità con il Decreto Legislativo 26/2014 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici e dopo approvazione da parte del Ministero della Salute (permesso numero 99/2022-PR).

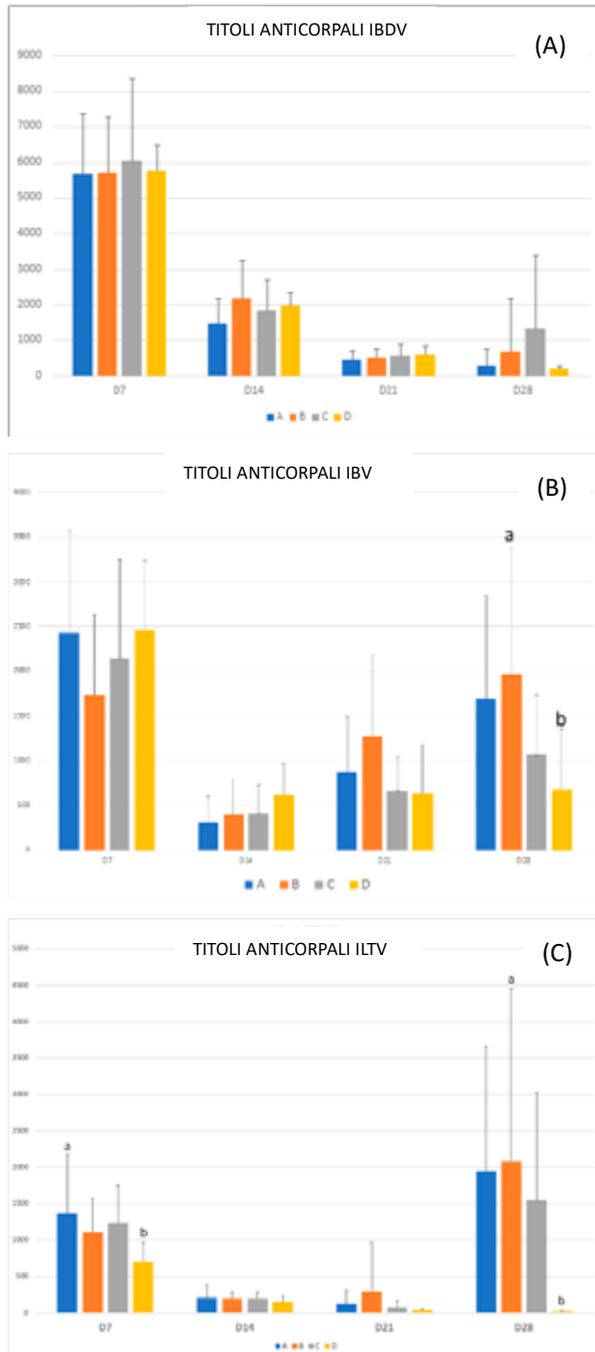
## **RISULTATI**

L'analisi sierologica ha mostrato in tutti i gruppi sperimentali lo stesso andamento anticorpale per IBDV, senza differenze statisticamente significative (Figura 1A). I titoli anticorpali per ILTV e IBV (Figura 1B e 1C) hanno mostrato un rialzo da 14 a 28 giorni di età, in tutti i gruppi sperimentali eccetto che nel gruppo non vaccinato (gruppo D). Nel gruppo vaccinato con Nobilis Gumboro® 228E (gruppo B) i titoli anticorpali per ILTV e IBV sono risultati più elevati, con differenze statisticamente significative rispetto al controllo, a 28 giorni di età.

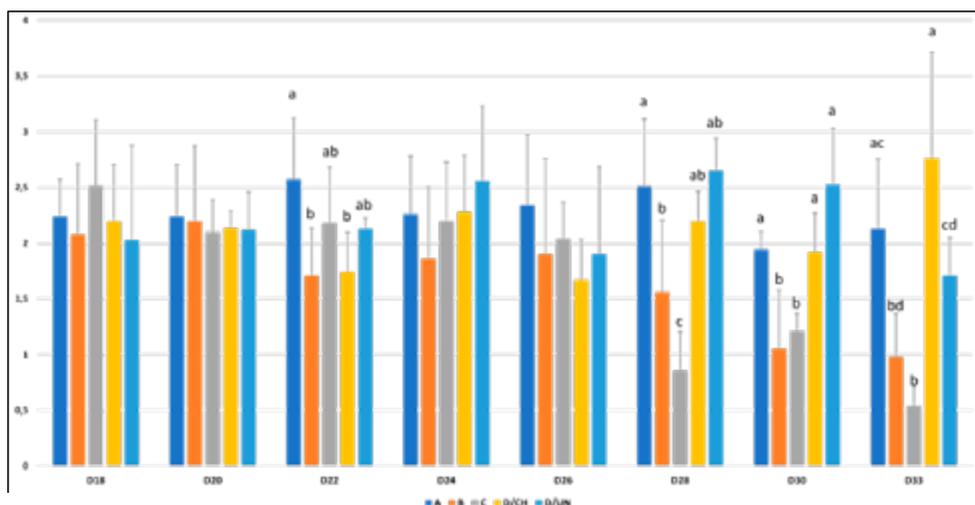
In tutti i gruppi sperimentali vaccinati e sottoposti ad infezione di prova, non sono stati osservati sintomi clinici, mortalità o lesioni anatomopatologiche e istopatologiche riferibili a Bursite infettiva aviare; Il gruppo DCH non vaccinato e sottoposto a infezione di prova a 28 giorni di età, ha mostrato nella borsa di Fabrizio lesioni anatomopatologiche e istopatologiche riferibili a IBD.

Il rapporto peso borsa/peso corporeo (Figura 2) è risultato più basso a 28, 30 e 33 giorni di età negli animali vaccinati con Nobilis® 228E (gruppo B) e con il vaccino a immunocomplessi (Gruppo C), rispetto agli animali vaccinati con Nobilis® D78 (Gruppo A) ed ai controlli (Gruppo D).

I risultati della analisi NGS eseguite sulle borse sono riportati in Tabella 1. Nei gruppi B e C, vaccinati rispettivamente con Nobilis® 228E ed il vaccino ad immunocomplessi è stata rilevata la prevalenza del ceppo vaccinale somministrato rispetto al virus challenge IBDV *very virulent* CS89. Nel gruppo A, vaccinato Nobilis® D78, è stata rilevata quasi esclusivamente la presenza del virus challenge. L'analisi della citometria di flusso ha mostrato un aumento della popolazione dei linfociti T (CD3+) a 33 giorni di età in tutti i gruppi, e anche da 22-26 giorni di età nel gruppo vaccinato con Nobilis® 228E.



**Figura 1.** Andamento della media dei titoli anticorpali per IBDV (A), IBV (B) e ILTV (C). Differenti indici indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi.



**Figura 2.** Medie del rapporto peso borsa/peso corporeo nei gruppi sperimentali alle diverse età post-infezione sperimentale. Differenti indici indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi.

Gruppo	D18	D20	D22	D24	D26	D28	D30	D33
A	0/6	4vv/10	2vv/10	2vv/10	2vv/10	0/10	3vv+ 1VAC/6	1vv/6
B	0/6	0/10	7VAC/10	0/10	2CH+ 5VAC/10	9VAC/10	5VAC/6	3VAC/6
C	2vv/6	0/10	0/10	1VAC/10	0/10	8VAC/10	1vv+ 1VAC/6	2VAC/10
D	0/4	0/4	0/4	1vv/4	2vv/4	0/4	1vv/4	4vv/4

**Tabella 1.** Risultati delle analisi NGS. n/n = numero di animali positivi per IBDV/ numero di animali analizzati; vv = ceppo IBDV *very virulent* CS89; VAC = ceppo vaccinale.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati del presente lavoro hanno mostrato che i vaccini vivi attenuati Nobilis® 228E o Nobilis® D78 somministrati per via sottocutanea al primo giorno di vita proteggono gli animali dall'infezione con ceppo *very virulent* IBDV sino a 28 giorni di vita e non influenzano negativamente la risposta anticorpale conferita dalle vaccinazioni per ILTV e IBV. Inoltre, la vaccinazione con Nobilis® 228E al primo giorno di vita previene la colonizzazione della borsa da parte del ceppo challenge in egual misura al vaccino a immunocomplessi. Ciò permette di ipotizzare che il suo impiego in campo possa controllare la circolazione del virus selvaggio.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Lupini C, Quaglia G, Mescolini G, Russo E, Salaroli R, Forni M, Boldini S, Catelli E. (2020) Alteration of immunological parameters in infectious bronchitis vaccinated-specific pathogen-free broilers after the use of different infectious bursal disease vaccines. *Poult Sci.* 99(9):4351-4359.
2. Sharma, JM, Dohms, JE, Metz AL. (1989) Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 33: 112–124.
3. Müller H, Mundt E, Eterradossi N, Islam MR. (2012) Current status of vaccines against infectious bursal disease *Avian Pathol.* 41(2):133-9.

# IMPATTO DELLA DIFFUSIONE GLOBALE, DELL'EPIDEMIOLOGIA E DELLE STRATEGIE DI CONTROLLO SULL'EVOLUZIONE DEL LINEAGE GI-19 (GENOTIPO QX) DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA

Franzo G., Faustini G., Tucciarone C. M., Poletto F., Tonellato F. R., Cecchinato M., Legnardi M.

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

## Summary

The GI-19 lineage of infectious bronchitis virus (IBV) has emerged as one of the most impactful, particularly in the “Old World”. Originated in China several decades ago, it has spread and evolved, forming independent clades in various regions, each differing in terms of production systems and control strategies. This study explores how different environments influence virus evolution by analyzing the complete sequence of the S1 gene. Four datasets were identified, comprising strains of monophyletic clades circulating in different continents or countries (e.g., Asia vs. Europe and China vs. Thailand), indicating single introduction events and independent evolution. Population dynamics, evolutionary rate variation, and selective pressures were estimated and compared across these datasets. Since QX emergence in the mid-20th century, a more persistent and stable viral population was seen in Asia and China, while Europe and Thailand showed a sharp increase following a relatively recent introduction (around 2005 and 2007, respectively), followed by a rapid decline. Although more sites within the S1 subunit were under diversifying selection in the Asian and Chinese datasets, stronger pressures were evident in the European and Thai strains, likely reflecting more intense and uniform vaccine application. However, a significant inverse correlation was found between viral population size and the rate of viral evolution over time. Therefore, despite the stronger selective pressure imposed by vaccination, effectively constraining the former through adequate control strategies can efficiently prevent viral evolution and the emergence of vaccine-escaping variants.

## INTRODUZIONE

I virus a RNA sono caratterizzati da alti tassi di mutazione e ricombinazione, che consentono loro di esplorare rapidamente diverse soluzioni evolutive. Le conseguenze per la flessibilità biologica, e di conseguenza per la salute umana e animale, sono ben documentate: salti di ospite, comparsa di resistenza agli antivirali ed evasione dell'immunità dell'ospite, solo per citarne alcune (Geoghegan et al., 2016; Duffy, 2018). Tuttavia, un alto tasso di mutazione fornisce semplicemente un substrato per l'evoluzione; sono necessarie altre forze per selezionare varianti dotate effettivamente di maggiore fitness. La selezione naturale è un motore chiave nell'evoluzione degli organismi, inclusi i virus. Affinché questa possa agire, è però necessaria non solo la presenza di una pressione selettiva, ma anche una grande popolazione di organismi su cui questa possa agire (i.e.  $s \times N_e \gg 1$ , dove  $s$  rappresenta il coefficiente di selezione e  $N_e$  è la dimensione effettiva della popolazione). Nel mondo dei virus, l'ospite è il determinante primario, in quanto condiziona sia la forza delle pressioni selettive che la dimensione della popolazione vi-

rale. Inoltre, fattori ambientali che influenzano la struttura della popolazione ospite, la rete di contatti e la suscettibilità all'infezione agiscono a un livello gerarchico superiore, influenzando ulteriormente l'esito dell'evoluzione virale. Nella produzione zootecnica, le misure gestionali e di controllo, che variano significativamente tra e all'interno delle aree geografiche, contribuiscono anch'esse a questo determinismo.

Il virus della bronchite infettiva (IBV), un membro della specie *Avian coronavirus*, famiglia *Coronaviridae*, genere *Gammacoronavirus*, è uno dei patogeni virali più significativi nel pollame, responsabile di ingenti perdite economiche a livello mondiale, attribuibili sia a costi diretti che indiretti. IBV causa principalmente malattie delle vie respiratorie superiori, che possono portare a un'alta mortalità in presenza di infezioni secondarie, e nefrite nel caso di alcuni ceppi. Anche il tratto genitale degli uccelli da riproduzione e da allevamento può essere colpito, causando disturbi riproduttivi e alterata produzione di uova (Legnardi et al., 2020). Il genoma virale, lungo circa 27 kb, codifica sia proteine non strutturali (come la RNA polimerasi RNA-dipendente e altre proteine accessorie e regolatorie) che proteine strutturali (cioè, le proteine spike, envelope, membrane e nucleocapside) (Jackwood et al., 2012). La proteina spike (S), e in particolare la sua subunità S1, è ampiamente studiata per via del suo ruolo nel tropismo cellulare e come bersaglio primario della risposta immunitaria dell'ospite, inclusi anticorpi neutralizzanti e immunità cellulo-mediata. Pertanto, la regione S1 ben si presta ad investigare le forze evolutive che agiscono sul genoma e sul fenotipo virale. Inoltre, a causa della sua notevole eterogeneità genetica (Franzo et al., 2017; Moreno et al., 2017), la regione S1 è la più comunemente sequenziata sia per scopi di classificazione che per analisi di epidemiologia molecolare. Attualmente, il sistema di classificazione più riconosciuto prevede la differenziazione di IBV in genotipi, ulteriormente suddivisi in *lineage*, basato su soglie di distanza genetica e analisi filogenetiche della regione S1 (Valastro et al., 2016).

In particolare, il *lineage* GI-19 (anche noto come QX) di IBV è stato selezionato nel presente studio per diverse ragioni. Dopo la sua origine in Asia, si è diffuso nel "Vecchio Mondo", in particolare in Europa, dove si è stabilito con successo in ambienti e sistemi produttivi diversi, diventando dominante (Franzo et al., 2017). A causa del suo significativo impatto economico, è stato sottoposto a monitoraggio intenso, e sono quindi disponibili diverse sequenze con adeguati metadati. Per lo stesso motivo, sono state implementate varie strategie di controllo per mitigare il suo impatto, sebbene gli approcci scelti siano variati considerevolmente tra le diverse regioni e all'interno di esse (Franzo et al., 2016). Gli effetti delle diverse strategie di intervento, in particolare la vaccinazione, sulla dinamica della popolazione e sull'evoluzione del genotipo GI-19 sono stati valutati indipendentemente a livello locale (Franzo et al., 2016, 2019), dimostrando il significato biologico dei sistemi gestionali sull'evoluzione del GI-19-IBV. Tuttavia, mancano dati sull'interazione di queste dinamiche con altre forze su una scala più ampia. Infine, essendo IBV un coronavirus, le intuizioni sui suoi modelli evolutivi e sulle forze che ne sono alla base, possono fornire informazioni preziose per una migliore comprensione e controllo di altri coronavirus umani e animali.

## **MATERIALI E METODI**

### *2.1 Dataset*

Le sequenze complete del gene S1, per le quali erano disponibili il paese e l'anno di raccolta, sono state scaricate da GenBank. Le sequenze appartenenti al *lineage* GI-19 sono state selezionate tramite analisi filogenetica, una volta allineate al dataset di refe-

renza proposto da Valastro et al. (2016), utilizzando Translator X (Abascal et al., 2010). L'albero filogenetico è stato ricostruito basandosi su questo allineamento utilizzando IQ-TREE (Nguyen et al., 2015), la robustezza delle clade è stata verificata eseguendo 1000 repliche bootstrap. La presenza di eventi di ricombinazione tra le sequenze selezionate è stata valutata utilizzando GARD (Kosakovsky Pond et al., 2006). L'analisi filogenetica preliminare ha rivelato un significativo clustering geografico, con ceppi europei e asiatici che si raggruppavano su rami separati, supportati da alti valori di bootstrap. Basandosi su questa evidenza, sono stati generati due dataset separati, includendo rispettivamente solo sequenze asiatiche ed europee. Eccezioni, come rari ceppi asiatici che si raggruppavano all'interno del clade europeo, sono state rimosse dal dataset, assumendo che rappresentassero reintroduzioni recenti, non evolute nell'area considerata per un lungo periodo di tempo. Inoltre, per valutare se la propensione del virus ad evolversi sia attribuibile a caratteristiche specifiche del cluster piuttosto che alle condizioni ambientali, sono stati considerati anche i sotto-cladi del gruppo asiatico, e sono stati creati dataset dedicati. In particolare, sono stati generati dataset comprendenti esclusivamente sequenze cinesi e thailandesi. Questi paesi sono stati selezionati perché fornivano un numero adeguato di sequenze che formavano una clade monofiletica nell'albero filogenetico, indicativo di un'evoluzione indipendente (Figura 1).

## 2.2 Dinamiche della Popolazione e Ricostruzione dell'Evoluzione

Il *time to most recent common ancestor* (tMRCA), il tasso evolutivo e le dinamiche della popolazione virale sono stati ricostruiti utilizzando l'approccio bayesiano della coalescente seriale implementato in BEAST 1.10.4 (Suchard et al., 2018). Il modello di sostituzione nucleotidica è stato selezionato basandosi su un punteggio BIC calcolato utilizzando JmodelTest2 (Darriba et al., 2012). Il modello non parametrico Bayesian Skygrid (Hill e Baele, 2019) è stato implementato per ricostruire le dinamiche della popolazione virale (i.e. diversità genetica relativa: dimensione effettiva della popolazione  $\times$  tempo di generazione;  $N_e \times \tau$ ) nel tempo. Poiché i ceppi asiatici erano largamente sovrarappresentati, il dataset originale è stato ridimensionato per renderlo comparabile con il dataset europeo. A tal fine, sono stati generati sei dataset indipendenti campionando casualmente fino a quattro sequenze asiatiche per anno. Questo approccio ha permesso anche di valutare l'effetto del campionamento sulla robustezza dei risultati (Hall et al., 2016). Allo stesso modo, per il confronto Cina-Thailandia, il dataset cinese è stato sottocampionato, limitando le sequenze più recenti al 2017, quando era disponibile l'ultima sequenza thailandese. Le analisi sono state eseguite indipendentemente su ciascuno dei dataset definiti conducendo una catena di Markov Monte Carlo (MCMC) di cento milioni di generazioni, campionando i parametri della popolazione e gli alberi filogenetici ogni diecimila generazioni. I risultati sono stati riassunti in termini di media e del 95% *highest probability density* (95HPD). Gli alberi di credibilità massima del clade (MCC) sono stati costruiti e annotati utilizzando TreeAnnotator (pacchetto BEAST). Ulteriori statistiche riassuntive e output grafici sono stati generati utilizzando script R personalizzati con le librerie R ggplot2, treeio, ggtree e ips.

Per ciascun dataset, il tasso evolutivo medio per ciascun ramo dell'albero MCC è stato correlato con la dimensione della popolazione virale nel tempo utilizzando una *rolling window correlations* tra le due serie temporali regolari. La significatività statistica dei coefficienti di correlazione è stata stimata tenendo conto degli effetti dei test multipli tramite simulazioni Monte Carlo, come implementato nella libreria NonParRolCor (Polan-

co-Martínez e López-Martínez, 2023) di R. In breve, il test si basa su simulazioni Monte Carlo nella quale viene permutata la variabile dipendente in analisi e mantenuta fissa la variabile indipendente. Un valore critico per i coefficienti di correlazione per ciascuna finestra mobile è stato inoltre calcolato testando finestre temporali di diversa lunghezza. Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato calcolato, impostando la significatività statistica a  $p < 0,05$  (cioè, il 95° quantile del valore critico). Sono state valutate finestre temporali di diverse lunghezze, con incrementi di due anni, a partire da un minimo di tre anni sino alla durata totale dello studio, e sono stati valutati il coefficiente di correlazione e la significatività per ciascuna finestra.

### 2.3 Analisi delle Pressioni Selettive

L'azione delle pressioni selettive per ciascun dataset (cioè, Europa vs. Asia e Cina vs. Thailandia) è stata stimata utilizzando metodi basati sul calcolo della differenza tra i tassi di sostituzione non sinonima e sinonima (dN-dS). La presenza e l'intensità della selezione diversificante pervasiva ed episodica sono state valutate utilizzando FUBAR (Murrell et al., 2013) e MEME (Murrell et al., 2012). Un confronto sito per sito delle forze che agiscono su ciascuna posizione amminoacidica della proteina S1 è stato eseguito utilizzando il metodo contrast-FEL (Kosakovsky Pond et al., 2021). Questo approccio identifica siti di allineamento individuali dove due (o più) insiemi di rami in un albero filogenetico hanno rapporti dN/dS differenti. In questo studio, sono stati confrontati i modelli evolutivi di Asia vs. Europa e Cina vs. Thailandia. Gli alberi filogenetici richiesti sono stati ricostruiti utilizzando IQ-TREE. Il livello di significatività statistica è stato impostato a  $p < 0.05$  per MEME e una probabilità a posteriori  $> 0.9$  per FUBAR. Il valore q corretto per il tasso di falsi positivi (FDR) di 0.1 è stato selezionato per contrast-FEL.

### 2.4 Homology modelling

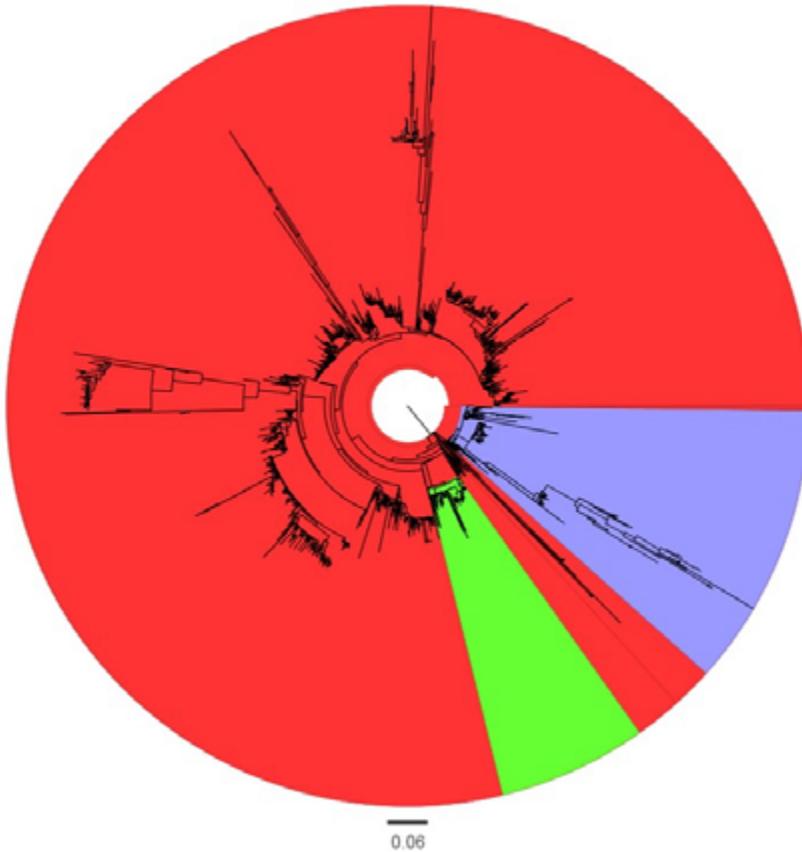
Per valutare la posizione e la distribuzione dei siti sotto pressione selettiva, la sequenza nucleotidica di una subunità S1 di un ceppo rappresentativo GI-19 è stata tradotta a livello amminoacidico, ed è stato utilizzato il server web SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018) per identificare il miglior template con una struttura quaternaria determinata sperimentalmente. Lo stesso programma è stato utilizzato per stimare la struttura proteica tramite un approccio di *homology modelling*.

## RISULTATI

### 3.1 Dataset

Un totale di 1802 sequenze GI-19, provenienti da 28 paesi nel periodo 1993-2022, sono state incluse nel dataset finale. Di queste, 1612 provenivano da paesi Asiatici e 181 dall'Europa. Non è stata rilevata alcuna evidenza statisticamente significativa di ricombinazione tra i ceppi inclusi nello studio.

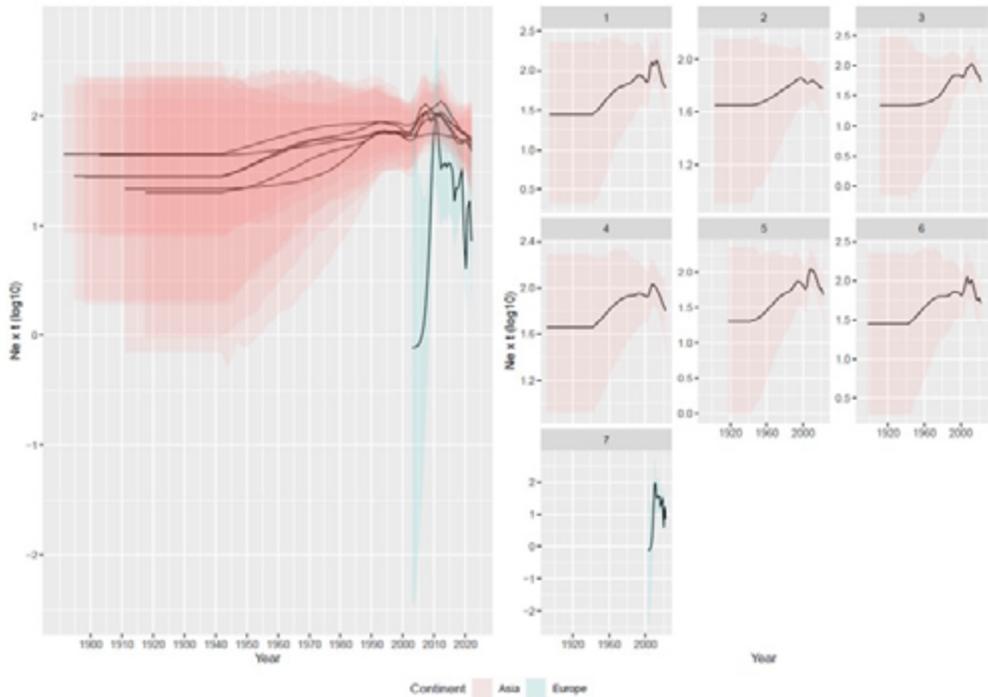
L'analisi filogenetica ha dimostrato un clustering geografico distinto delle sequenze asiatiche ed europee, con poche eccezioni. Inoltre, all'interno del cluster asiatico, composto principalmente da ceppi cinesi, era presente un cluster monofiletico thailandese (Figura 1), permettendo la definizione di quattro dataset indipendenti per ulteriori analisi.



**Figura 1.** Albero filogenetico a massima verosimiglianza basato sulle sequenze S1 selezionate. Le clade asiatiche, europee e thailandesi sono evidenziate rispettivamente in rosso, blu e verde.

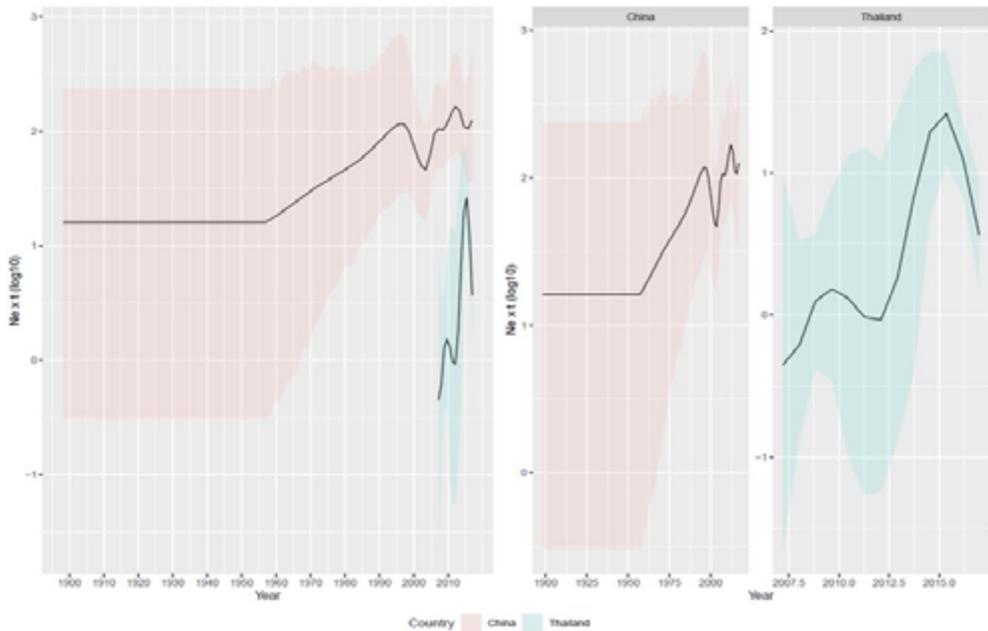
### 3.2 Ricostruzione delle Dinamiche di Popolazione e dell'Evoluzione Virale

La ricostruzione della storia della popolazione dei ceppi asiatici di GI-19 ha indicato un'origine relativamente antica, approssimativamente a metà del XX secolo (tMRCA medio ottenuto nelle diverse run: 1940.85 [95HPD = 1899.8-1979.7]). L'inferenza sulle dinamiche di popolazione ha evidenziato risultati coerenti tra i dataset (Figura 2). È stato osservato un aumento progressivo della diversità genetica relativa dal tMRCA fino a circa il 2010, con un calo temporaneo intorno al 2000. Successivamente, è continuata una tendenza decrescente fino alla fine dello studio.



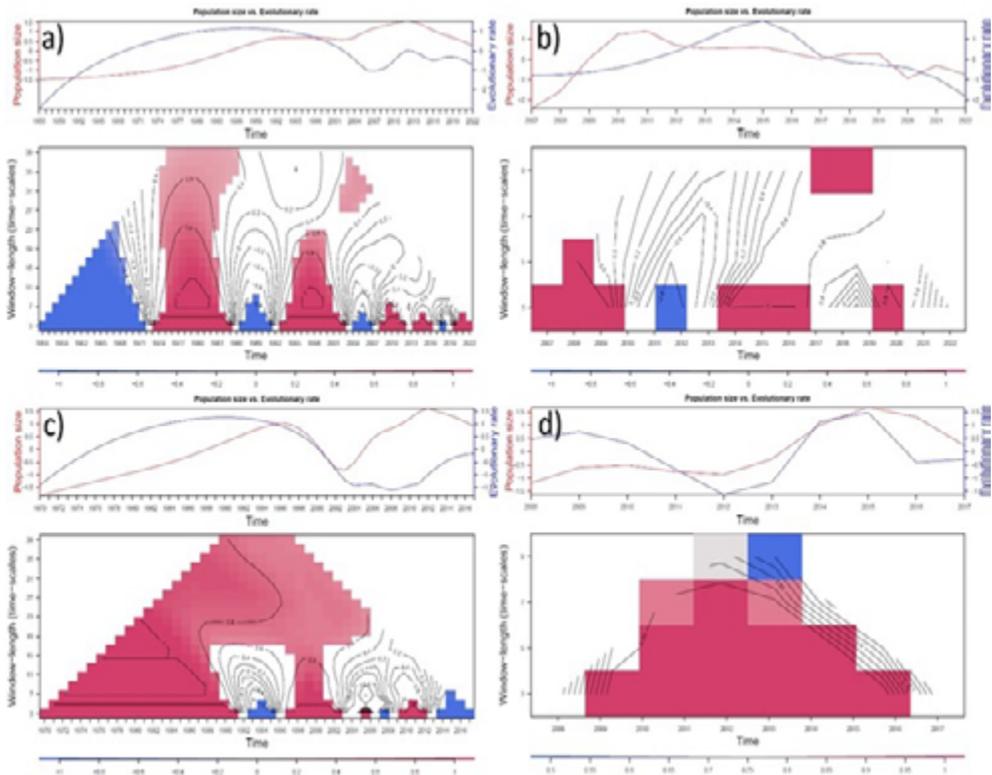
**Figura 2.** Sinistra: media e valori di 95HPD superiori e inferiori della diversità genetica relativa ( $N_e \times \tau$ ) delle popolazioni GI-19 asiatiche (rosso) ed europee (blu). Destra: media e valori di 95HPD superiori e inferiori riportati per ciascun dataset.

Il dataset europeo ha rivelato un'introduzione più recente (circa nel 2005) seguita da un'espansione brusca e successivamente da una rapida e marcata diminuzione (Figura 2). Analizzando solo le sequenze cinesi, il tMRCA stimato e le dinamiche di popolazione riflettevano in gran parte l'andamento complessivo asiatico, caratterizzato da un aumento progressivo dal tMRCA (media = 1948.64 [95HPD = 1897.12-1980.88]) fino al 2000, seguito da un breve declino e poi da un picco maggiore nel 2010, dopo il quale la popolazione virale ha iniziato a diminuire (Figura 3). L'introduzione del virus in Thailandia è stata stimata intorno al 2007 [95HPD: 2006.56-2007.94]; la dimensione della popolazione virale è aumentata progressivamente, con lievi fluttuazioni fino al 2015, per poi diminuire significativamente (Figura 3).



**Figura 3.** Rappresentazione della diversità genetica relativa nel tempo del *lineage* GI-19 calcolata in base ai dataset cinesi e thailandesi. I valori medi sono rappresentati come una linea nera, mentre gli intervalli 95HPD sono mostrati come aree ombreggiate in rosso (Cina) o blu (Thailandia).

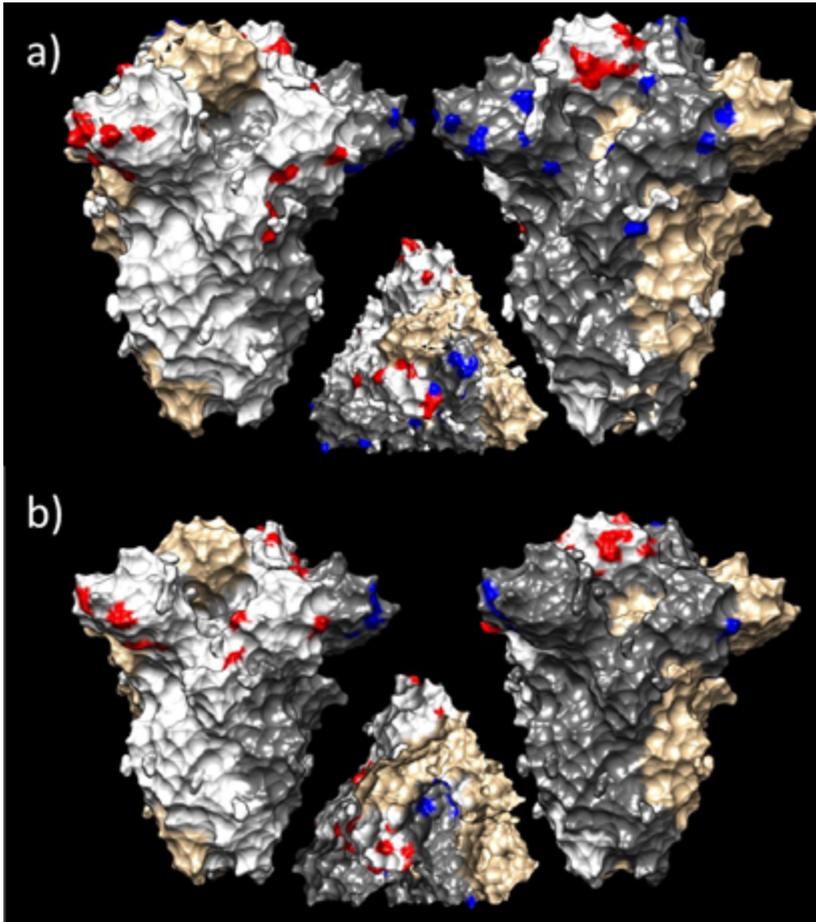
Il tasso evolutivo complessivo è stato stimato approssimativamente tra  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , indipendentemente dal dataset considerato. L'analisi delle correlazioni a finestra mobile tra la dimensione della popolazione virale e il tasso evolutivo ha tuttavia evidenziato una correlazione positiva e statisticamente significativa, con un aumento del tasso evolutivo corrispondente a dimensioni maggiori della popolazione e viceversa. Tuttavia, questa associazione, sebbene generalmente vera, non ha sempre raggiunto la significatività statistica per l'intero periodo considerato e, in alcune brevi finestre temporali, è risultata negativa. Valutando finestre di diversa lunghezza, è stata osservata una correlazione più forte per intervalli di tempo più brevi in tutti i dataset osservati (Figura 4).



**Figura 4.** Risultati dell'analisi dei coefficienti di correlazione tra dimensione della popolazione virale e tasso evolutivo per i dataset a) asiatico, b) europeo, c) cinese e d) thailandese. Per ciascun dataset, il pannello superiore riporta l'andamento (centrato e scalato) di entrambe le variabili, mentre in quello inferiore riporta i coefficienti di correlazione calcolati per diversi anni e dimensioni della finestra temporale. I coefficienti non statisticamente significativi (livello di confidenza del 95%) sono riportati in bianco. La forza della correlazione è stata codificata a colori. Le linee di contorno indicano valori simili dei coefficienti di correlazione. Per aumentare la robustezza dei risultati, le analisi sono state eseguite a partire da un valore di tMRCA medio.

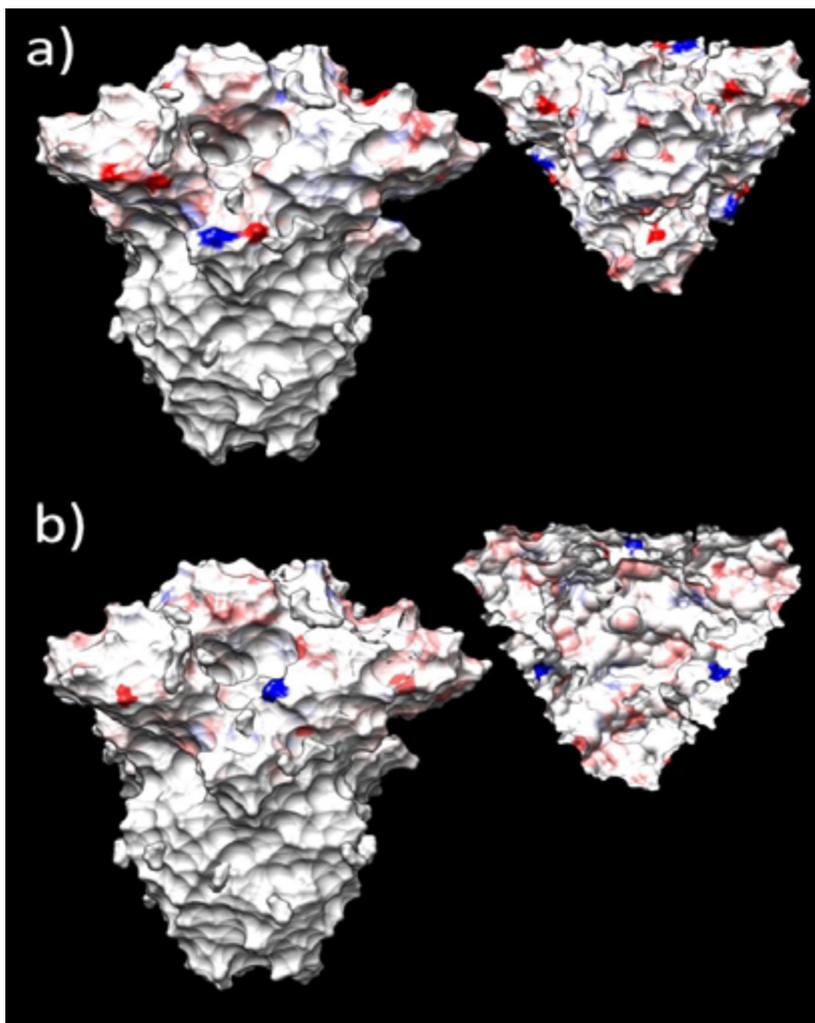
### 3.3 Analisi delle Pressioni Selettive

L'analisi FUBAR ha rilevato 25 siti sotto selezione diversificante pervasiva nel dataset asiatico e 13 in quello europeo. Tuttavia, utilizzando MEME, sono stati identificati 41 siti sottoposti a selezione diversificante episodica tra le sequenze asiatiche e 32 tra quelle europee (Figura 5). Un numero limitato di codoni è stato trovato sotto la stessa pressione in diversi dataset; specificamente, FUBAR ha rilevato i codoni 58, 64, 65, 132, 331 e 389, e MEME i codoni 58, 62, 65, 89, 96, 120, 315, 321, 333, 389, 415, 483 e 522.



**Figura 5.** Diverse prospettive della struttura quaternaria della proteina spike di IBV. Le regioni S1 sono state modificate per evidenziare le diverse caratteristiche delle pressioni selettive. a) i siti sotto selezione diversificante episodica nei dataset asiatici (rosso) ed europei (blu) sono riportati nel monomero bianco e grigio. Il monomero ocra è stato riportato per rappresentare la struttura complessiva della spike. b) Lo stesso schema di colori è stato utilizzato per confrontare Cina (rosso) e Thailandia (blu). Le immagini sono state generate con il server web SWISS-MODEL e modificate con Chimera.

Nonostante il numero maggiore di siti sotto selezione diversificante nel dataset asiatico, confrontando dN-dS sito per sito tra i due dataset, quello europeo ha mostrato una forza selettiva diversificante complessivamente più forte, specialmente sulla superficie della S1 (Figura 6). Questo è stato confermato dall'analisi contrast-FEL, che ha rilevato azioni diverse di selezione diversificante in 7 siti. In 5 siti (cioè, 2, 52, 54, 222 e 379), è stato stimato un tasso di sostituzione non sinonimo più alto tra i ceppi europei, e in 2 siti (cioè, 22 e 167) tra quelli asiatici. Anche in questo caso, erano coinvolti siti esposti sulla superficie della S1.



**Figura 6.** Diverse prospettive della struttura quaternaria della proteina spike di IBV. Le regioni S1 sono state modificate per evidenziare le diverse caratteristiche delle pressioni selettive. La differenza dN-dS tra a) Europa e Asia e b) dataset Thailandia e Cina, calcolata utilizzando FUBAR, è riportata utilizzando una scala continua di colori che va da valori positivi (rosso) a negativi (blu).

La valutazione dei dataset cinesi e thailandesi ha rivelato rispettivamente 12 e 31 posizioni della S1 sotto selezione diversificante pervasiva secondo FUBAR, mentre 34 e 20 sono state stimate sotto selezione diversificante episodica secondo MEME. I siti 39, 58, 65, 119, 120, 167, 282, 390, 437 e 484 sono stati rilevati da FUBAR in entrambi i dataset, mentre 65, 120, 167, 288, 292, 321, 322, 383, 390 e 484 da MEME. È stata rilevata una pressione selettiva complessivamente più forte che agisce sulla superficie virale tra i ceppi

thailandesi (Figura 6). Di conseguenza, tutti i 18 siti (cioè, 10, 12, 32, 56, 62, 64, 65, 78, 95, 96, 119, 128, 140, 182, 292, 304, 320 e 323) rilevati sotto selezione diversificante differenziale da contrast-FEL erano sotto pressione più forte nel dataset thailandese.

## DISCUSSIONE

Storicamente, l'epidemiologia di IBV è stata caratterizzata dall'emergere di nuove varianti genetiche con diversi livelli di virulenza e caratteristiche epidemiologiche. Mentre alcune varianti sono rimaste confinate a specifiche regioni geografiche o sono scomparse rapidamente, altre hanno dimostrato la capacità di diffondersi su lunghe distanze e di mantenere la loro presenza per lunghi periodi (Valastro et al., 2016; Cook et al., 2012; Jackwood, 2012). Si ritiene che il *lineage* GI-19, originatosi in Cina decenni fa, si sia successivamente diffuso in altri paesi asiatici, in Europa e in Africa (Franzo et al., 2017). Il presente studio non solo conferma l'origine antica di GI-19, ma suggerisce anche un'emergenza ancora più precoce di quanto precedentemente creduto. È interessante notare che, nonostante la sua lunga storia e capacità di migrare su lunghe distanze, sia stato osservato un forte clustering geografico che separa i ceppi asiatici da quelli europei. In contrasto con la notevole dispersione locale, sono stati inferiti rari eventi di introduzione a lunga distanza o intercontinentale. Questo modello di distribuzione può essere spiegato dalla necessità di contatti relativamente diretti, improbabili tra paesi privi di forti legami commerciali o culturali (Houta et al., 2021). È tuttavia interessante sottolineare come sia stato identificato una piccola clade asiatico derivante da quello europeo. Sebbene non direttamente rilevante per lo scopo di questo studio, questo risultato potrebbe riflettere un modello precedentemente osservato per il *lineage* GI-16 (Q1) di IBV (Franzo et al., 2018), e le sue implicazioni epidemiologiche e i potenziali sviluppi dovrebbero essere considerati e monitorati.

La presenza di tali clustering distinti e l'occorrenza di un clade europeo monofiletico (indicativo di un singolo evento di introduzione) hanno permesso l'indagine dei modelli evolutivi e delle dinamiche dei ceppi che circolano indipendentemente in ambienti diversi. Uno scenario simile era presente anche all'interno dell'Asia, con una ampia clade thailandese derivante da quello cinese. Questo doppio confronto ci ha permesso di valutare se dinamiche comparabili agiscono localmente e di determinare se la propensione dei virus a evolversi sia attribuibile a caratteristiche specifiche del cluster piuttosto che a condizioni ambientali o gestionali. Le clade asiatiche ed europee hanno mostrato un tasso evolutivo sostanzialmente comparabile. Pertanto, il potenziale evolutivo dei due gruppi può essere considerato simile.

Tuttavia, le dinamiche della popolazione virale delle due clade nel tempo differivano significativamente. In tutti i dataset generati casualmente, la clade asiatica era caratterizzata da un aumento progressivo della dimensione della popolazione (sebbene con una leggera fluttuazione intorno al 2000), raggiungendo il picco intorno al 2010, e diminuendo moderatamente successivamente. Questo modello può essere attribuito a una lenta ma costante espansione nella popolazione ospite colpita, indicativa di una limitata interconnessione tra le località asiatiche (che comporta una lenta dispersione virale) combinata con misure di controllo poco efficaci. A sostegno di questa ipotesi, il declino osservato intorno al 2000 potrebbe essere un effetto indiretto di attività di monitoraggio più efficaci e dell'implementazione di misure di biosicurezza più rigorose contro l'influenza aviaria (Chen, 2009; Sarkar e Bandyopadhyay, 2003). Il successivo rapido aumento della dimensione della popolazione di GI-19 potrebbe essere attribuito all'intensificazione dell'industria avicola

asiatica, che ha comportato una densità animale più elevata, maggiore movimentazione, ecc. Questa intensificazione potrebbe aver creato condizioni favorevoli alla diffusione e moltiplicazione del virus, sottolineando la complessa interazione tra pratiche agricole ed epidemiologia virale.

Al contrario, la storia della popolazione europea di GI-19 è stata molto più turbolenta. Un forte aumento si è verificato dopo l'introduzione virale, potenziato dalla stretta interconnessione del sistema di produzione avicola e dall'assenza di barriere commerciali all'interno del mercato comune europeo. Successivamente, è stato stimato un calo altrettanto rapido, probabilmente dovuto all'implementazione di misure di controllo efficaci. In Europa, la vaccinazione contro IBV è di routine e, nonostante una straordinaria varietà di protocolli applicati in diversi paesi, aziende di produzione o anche allevamenti (Legnardi et al., 2020), nella maggior parte dei casi viene utilizzata una vaccinazione eterologa con vaccini basati sul genotipo GI-1 (Mass) in combinazione con un altro genotipo (comunemente GI-13, noto anche come 793B). Tali strategie si sono dimostrate efficaci nel controllare l'infezione da GI-19 sia in condizioni sperimentali che di campo (Awad et al., 2016; Kutle et al., 2020). Inoltre, a partire dal 2015 circa, sono divenuti disponibili e applicati costantemente sul campo vaccini omologhi basati su GI-19. La pronta risposta del sistema avicolo europeo, motivata dall'impatto che il *lineage* GI-19 aveva sulla produzione avicola, ha portato a una riduzione dell'occorrenza di focolai e della circolazione virale (Franzo et al., 2016).

Sebbene la vaccinazione contro IBV sia ora comunemente applicata nei paesi asiatici, vi sono alcune differenze sostanziali. Inizialmente, l'emergenza e la circolazione di GI-19 si sono verificate quando strategie di vaccinazione efficaci non erano ancora sviluppate o non potevano essere ampiamente applicate in Asia. La persistenza e l'espansione lenta di GI-19 possono essere state facilitate dall'esistenza di un settore rurale caratterizzato da scarse misure di biosicurezza e gestionali, e da risorse economiche inadeguate. Una valutazione più accurata della situazione in Cina potrebbe fornire migliori dettagli sul rapporto tra strategie di controllo ed epidemiologia virale. Il primo vaccino GI-13 (ceppo 4/91) è stato introdotto in questo mercato intorno al 2000. Inizialmente, la combinazione 793B più Mass era applicata solo ai riproduttori, mentre una bassa percentuale di allevamenti di broiler e ovaiole adottava questo approccio, mirando a limitare i costi elevati. Nel 2009, è stato introdotto un vaccino basato su GI-13, più economico, che ha progressivamente guadagnato quota di mercato in queste categorie. È significativo in tal senso notare che un lieve declino della popolazione di GI-19 è stato osservato intorno al 2000, mentre un declino persistente era osservabile nella popolazione asiatica (rappresentata in gran parte da ceppi cinesi) dopo il 2010. Inoltre, nel 2012, è stato introdotto il primo vaccino QX, basato sul ceppo LDT-3 A.

Tuttavia, è stato solo alla fine del decennio che la strategia di protezione omologa è diventata predominante, con l'introduzione di IB QXL-87 nel 2018 che ha guadagnato la maggior parte del mercato. Infine, un nuovo vaccino basato su GI-13 (ceppo 1/96) è stato autorizzato nel 2019, dando ulteriore impulso alla campagna di vaccinazione. Un netto calo della popolazione virale asiatica è stato osservato nello stesso periodo. Pertanto, è altamente probabile che solo l'applicazione sistematica di una vaccinazione omologa o eterologa sia stata efficace. Una singola vaccinazione non omologa o una copertura parziale della popolazione, anche con una vaccinazione eterologa combinata, risultavano probabilmente inefficaci o solamente in grado di rallentare la circolazione virale.

È interessante notare che il declino virale è stato molto più lento rispetto alle stime euro-

pee. In Cina, diverse aziende sono passate a vaccini prodotti localmente, meno costosi, e hanno diminuito l'intensità e la standardizzazione dell'applicazione della vaccinazione per ridurre i costi di vaccinazione, in particolare durante la stagione calda quando la percezione dell'intensità della circolazione virale e della malattia è minore. Una tale strategia si è dimostrata rovinosamente inefficace in Italia in condizioni di campo (Franzo et al., 2016). Nonostante lo scenario sopra menzionato non sia rappresentativo dell'intero sistema avicolo cinese, la persistenza di tali sacche di protezione subottimale spiega probabilmente la persistenza e la diffusione prolungata del virus. Ulteriore supporto emerge dal confronto tra Cina e Thailandia. In Thailandia, i vaccini basati su Mass più 793B sono ampiamente applicati (Munyahongse et al., 2020). Di conseguenza, le dinamiche della popolazione in questo paese asiatico si sovrappongono a quelle europee, caratterizzate da un aumento brusco dopo l'introduzione virale seguito da un declino altrettanto rapido, quando la popolazione di GI-19 in Cina era ancora stabile o in aumento. È notevole che la vaccinazione omologa basata su GI-19 sia stata applicata per la prima volta in Thailandia solo dopo il 2017, a riprova che la vaccinazione eterologa combinata, se applicata ampiamente e correttamente, può controllare efficacemente il GI-19 in condizioni di campo. I diversi ambienti immunitari hanno anche influenzato la forza delle pressioni selettive. Nonostante un numero maggiore di siti sotto selezione diversificante pervasiva o episodica sia stato rilevato nelle sequenze asiatiche, quando le pressioni selettive sono state confrontate sito per sito, forze più intense agivano sulla subunità S1 dei ceppi europei. Sebbene ciò possa sembrare controintuitivo, un numero maggiore di siti sotto selezione significativa ma di minore intensità potrebbe essere dovuto a una popolazione virale più ampia circolante per lungo tempo in diverse condizioni ambientali, richiedendo l'adattamento a scenari multipli e variabili. Oltre alle differenti strategie di vaccinazione, numerose varianti di IBV sono state segnalate in Cina, contribuendo a un ambiente immunitario eterogeneo. Al contrario, le varianti di IBV nonché le condizioni di allevamento sono più omogenee in Europa, portando a pressioni più concentrate e più forti. Ad esempio, l'estesa somministrazione di vaccini, in particolare quelli omologhi, in una popolazione animale a breve vita potrebbe porre pressioni evolutive più intense ma meno diverse rispetto all'immunità naturale (Franzo et al., 2019). È notevole che la maggior parte dei siti sotto pressioni diversificanti fosse localizzata nelle regioni ipervariabili e superficiali dell'S1, sottolineando il ruolo della pressione immunitaria come motore della variabilità della proteina spike di IBV. L'analisi del clade thailandese supporta questa ipotesi in quanto anche in questo caso sono state stimate pressioni selettive più forti.

Questi risultati sollevano la questione di eventuali effetti collaterali della vaccinazione, favorendo e condizionando l'evoluzione virale. La presenza di forti pressioni selettive (cioè, coefficienti di selezione) è essenziale per l'azione della selezione naturale. Tuttavia, il ruolo della dimensione della popolazione non può essere trascurato, poiché la selezione naturale agisce principalmente su grandi popolazioni. Valutando la correlazione fra il tasso evolutivo e la dimensione della popolazione virale nel tempo, è stata rilevata una correlazione sostanzialmente positiva, indipendentemente dal dataset e dal periodo di tempo considerato. In altre parole, contenere efficacemente la dimensione della popolazione virale riduce significativamente il potenziale evolutivo di IBV. Pertanto, una strategia di vaccinazione pianificata adeguatamente dovrebbe essere incoraggiata non solo per i suoi benefici clinici immediati, ma anche per la capacità di ostacolare l'evoluzione virale nel lungo periodo. Al contrario, una vaccinazione inefficace, che consenta la continua circolazione virale in un 'ambiente vaccinato', dovrebbe essere vista come una grave minaccia nel lungo termine.

Questo scenario può portare all'emergere di varianti in grado di evadere la risposta immunitaria indotta dai vaccini, un fenomeno ampiamente riconosciuto nel contesto della resistenza antimicrobica. Una correlazione più elevata è stata generalmente osservata quando si consideravano brevi finestre temporali. Questo suggerisce una rapida risposta ai cambiamenti nelle dinamiche di popolazione. Sebbene ciò dimostri la flessibilità e il dinamismo dell'evoluzione di IBV (e di altri coronavirus), questa evidenza comporta anche delle opportunità, ossia la rapidità nei benefici derivanti dall'ottimizzare le strategie di controllo, sia da una prospettiva clinico-economica che epidemiologico-evolutiva.

Infine, la presenza di un clustering geografico così forte, con cladi monofiletici che persistono in ambienti caratterizzati da pressioni selettive differenziali, dovrebbe essere attentamente monitorata. Similmente a quanto accade negli organismi superiori, dove l'effetto del fondatore, l'isolamento e l'adattamento a nuovi ambienti possono portare a eventi di speciazione, tale compartimentalizzazione potrebbe essere un passo intermedio nell'emergere di nuovi *lineage* di IBV. Poiché i *lineage* attualmente riconosciuti filogeneticamente sono separati da rami lunghi, indicativi di una divergenza antica, l'emergenza in tempo reale di nuovi *lineage* deve ancora essere osservata e rimane una delle principali domande senza risposta nello studio dell'evoluzione di IBV.

Il presente studio affronta la complessa interazione dei determinanti che contribuiscono a plasmare l'evoluzione di GI-19 e, probabilmente, di altri ceppi di IBV e coronavirus in generale. La struttura e la gestione dei sistemi di allevamento, insieme alle strategie di controllo applicate e alla loro variazione nel tempo, hanno influenzato significativamente le dinamiche della popolazione di GI-19 e hanno esercitato forze selettive differenziali. Nelle aree in cui è stato possibile implementare strategie di controllo più intense, omogenee e organizzate, si è ottenuta una diminuzione rapida e notevole della circolazione di GI-19, nonostante l'aumento prevedibile delle pressioni selettive. Inoltre, queste strategie hanno efficacemente limitato il potenziale evolutivo del virus. L'identificazione di cladi monofiletici, determinati geograficamente e in evoluzione sotto diverse pressioni selettive, merita ulteriori monitoraggi e indagini poiché potrebbe rappresentare un passo cruciale nell'emergenza di nuovi *lineage* di IBV. Indagare questo processo può aiutare nella comprensione dell'evoluzione a lungo termine di questa classe di virus e rappresentare un prerequisito per prevenirla.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abascal F, Zardoya R and MJ Telford (2010). TranslatorX: Multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* 38: W7-13.
2. Awad F, Hutton S, Forrester A, Baylis M and K Ganapathy. (2016). Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathol.* 45: 169-77.
3. Chen H. (2009). H5N1 avian influenza in China. *Sci. China C Life Sci.* 52: 419-27.
4. Cook JKA, Jackwood M and RC Jones. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 41: 239-50.
5. Darriba D, Taboada GL, Doallo R and D Posada (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9: 772.
6. Duffy S. (2018). Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biol.* 16(8): e3000003.
7. Franzo G, Tucciarone CM, Blanco A, Nofrarias M, Biarnés M, Cortey M, Majó N, Catelli E and M Cecchinato. (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34: 5670-6.

8. Franzo G, Massi P, Tucciarone CM, Barbieri I, Tosi G, Fiorentini L, Ciccozzi M, Lavazza A, Cecchinato M and A Moreno. (2017). Think globally, act locally: Phylogenetic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales. *PLoS One* 12: e0184401.
9. Franzo G, Cecchinato M, Tosi G, Fiorentini L, Faccin F, Tucciarone CM, Trogu T, Barbieri I, Massi P and A Moreno. (2018). GI-16 lineage (624/I or Q1), there and back again: The history of one of the major threats for poultry farming of our era. *PLoS One* 13: e0203513.
10. Franzo G, Legnardi M, Tucciarone CM, Drigo M, Martini M, and M Cecchinato. (2019). Evolution of infectious bronchitis virus in the field after homologous vaccination introduction. *Vet. Res.* 50.
11. Geoghegan JL, Senior AM and EC Holmes. (2016). Pathogen population bottlenecks and adaptive landscapes: Overcoming the barriers to disease emergence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283: 20160727.
12. Hall MD, Woolhouse MEJ and A Rambaut (2016). The effects of sampling strategy on the quality of reconstruction of viral population dynamics using Bayesian skyline family coalescent methods: A simulation study. *Virus Evol.* 2.
13. Hill V and G Baele (2019). Bayesian Estimation of Past Population Dynamics in BEAST 1.10 Using the Skygrid Coalescent Model. *Mol. Biol. Evol.* 36: 2620–8.
14. 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: 3182.
15. Jackwood MW. (2012). Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis.* 56: 634–41.
16. Jackwood MW, Hall D and A Handel. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 1305–11.
17. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH and SDW Frost (2006). GARD: A genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22: 3096–8.
18. Kosakovsky Pond SL, Wisotsky SR, Escalante A, Magalis BR and S Weaver. (2021). Contrast-FEL: A test for differences in selective pressures at individual sites among clades and sets of branches. *Mol. Biol. Evol.* 38: 1184–98.
19. Kutle L, Ljuma Skupnjak L, Vrdoljak A, Jankovic D, Boelm GJ, Kelemen F, Zorman Rojs O and J Millecam. (2020). Efficacy of Infectious Bronchitis GI-13 (793B) Vaccine Candidate Tested According to the Current European Union Requirements and for Cross-Protection Against Heterologous QX-Like Challenge. *Viral Immunol.* 33: 555–64.
20. Legnardi M, Franzo G, Koutoulis KC, Wiśniewski M, Catelli E, Tucciarone CM and M Cecchinato. (2019). Vaccine or field strains: the jigsaw pattern of infectious bronchitis virus molecular epidemiology in Poland. *Poult. Sci.* 98: 6388–92.
21. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G and M Cecchinato. (2020). Infectious bronchitis virus evolution, diagnosis and control. *Vet. Sci.* 7(2): 79.
22. Moreno A, Franzo G, Massi P, Tosi G, Blanco A, Antilles N, Biarnes M, Majó N, Nofrarias M, Dolz R, Lelli D, Sozzi E, Lavazza A and M Cecchinato. (2017). A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 46: 28–35.

23. Munyahongse S, Pohuang T, Nonthabenjawan N, Sasipreeyajan J and A Thontiravong. (2020). Genetic characterization of infectious bronchitis viruses in Thailand, 2014–2016: identification of a novel recombinant variant. *Poult. Sci.* 99: 1888–95.
24. Murrell B, Wertheim JO, Moola S, Weighill T, Scheffler K and SL Kosakovsky Pond. (2012). Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS Genet.* 8.
25. Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL and K Scheffler. (2013). FUBAR: A fast, unconstrained Bayesian approximation for inferring selection. *Mol. Biol. Evol.* 30: 1196–205.
26. 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: 268–74.
27. Polanco-Martínez JM and JL López-Martínez. (2023). NonParRolCor: An R package for estimating rolling correlation for two regular time series. *SoftwareX* 22: 101353.
28. Sarkar M and M Bandyopadhyay. (2003). Avian Influenza “Bird Flu” Factsheet. *Bull. RGKMC* 8: 16–7.
29. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ and A Rambaut (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 4.
30. 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. *Infection, Genetics and Evolution* 39: 349–64.
31. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R and T Schwedel. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46: W296-W303.

# PRIMA IDENTIFICAZIONE DI CEPPI IB80-LIKE (GENOTIPO GVIII) DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA

Legnardi M.<sup>1</sup>, Poletto F.<sup>1</sup>, Andolfatto C.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Bianco L.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Veterinario settore avicolo*

## Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is one of the most impactful viral pathogens to affect the poultry industry, responsible for respiratory, renal and reproductive syndromes in chickens of all ages and productive types. IBV diagnosis and control, pursued by routine vaccination, are hampered by its high mutation rate and proneness to recombination, which results in the continuous emergence of new variants with diverse features in terms of pathogenicity, tissue tropism, and cross-protection. The case of IB80, a strain first described in 2015, is illustrative of the challenges stemming from this variability. IB80-like strains have been described since 2015 in European, Middle Eastern, and Asian countries. Most of the detections occurred in layer and breeder flocks and were possibly associated with egg production issues, although such a clinical manifestation could not be reproduced in experimental settings. Based on S1 sequencing, IB80 falls within lineage GVIII-2, and its marked genetic divergence from other circulating strains hampers its detection using the commonly applied biomolecular tests. The need for dedicated assays hindered our knowledge about the extent of its circulation, which has never or rarely been investigated in many productive contexts, including the Italian poultry sector.

Here, we describe the first detection of IB80-like strains in Italy, made possible by the development of an in-house GVIII-specific RT-PCR and its subsequent implementation in epidemiological investigations. In April 2024, four strains were detected in pools of tracheal or cloacal swabs collected from layer flocks raised in the Veneto, Lombardy and Emilia-Romagna regions. Based on partial S1 sequencing, the strains shared a 98.75-99.70% genetic identity and were 96.71-97.34% identical to the IB80 prototype strain. The presented results are critical to raise the awareness about GVIII-2 presence in Italy, prompting the need for updated diagnostic approaches and attentive monitoring.

## INTRODUZIONE

La bronchite infettiva (BI) è una patologia virale che può manifestarsi con forme respiratorie, renali o riproduttive in polli di tutte le età e categorie produttive, causando danni ingenti alla produzione avicola. L'endemicità del suo agente eziologico, noto come virus della bronchite infettiva (IBV), obbliga ad un ricorso pressoché routinario alla vaccinazione, basata primariamente sull'utilizzo di vaccini vivi attenuati, e secondariamente sulla somministrazione di vaccini inattivati per il *boosting* immunitario di ovaiole e riproduttori (Jordan, 2017).

Essendo un virus a RNA, IBV è contraddistinto da un alto tasso di mutazione, il quale, unitamente ad un'elevata propensione alla ricombinazione, causa il continuo emergere di nuove varianti genetiche, spesso contraddistinte da significative differenze in termini di patogenicità, tropismo tissutale, cross-protezione e distribuzione geografica. Tale variabilità ha profonde implicazioni pratiche sia in termini di controllo, richiedendo la frequente somministrazione di più vaccini basati su ceppi diversi per garantire una protezione adeguata, sia di approccio diagnostico, che deve essere adattato alla situazione epidemiologica locale e periodicamente aggiornato alla luce dell'evoluzione virale (Legnardi et al., 2020). La classificazione genetica attualmente in uso si basa sul sequenziamento del gene codificante per la subunità S1 della proteina *Spike*, la quale svolge un ruolo chiave nel determinare l'antigenicità e il tropismo d'ospite e tissutale. Ad oggi, sono noti otto diversi genotipi (GI-GVIII), ulteriormente suddivisi in più di trenta *lineage* (GI-1, GI-2, G2-1, ecc.) (Valastro et al., 2016; Chen et al., 2017; Jiang et al., 2017; Ma et al., 2019; Petzoldt et al., 2022).

Tra le novità epidemiologiche più rilevanti degli ultimi anni si annovera la descrizione del ceppo IB80, principale esponente del *lineage* GVIII-2 (Petzoldt et al., 2022). A partire dal 2015, ceppi IB80-like sono stati descritti in Polonia, Belgio, Francia, Germania, Paesi Bassi, Spagna, Ucraina, Lituania, Bielorussia, Russia, Kazakistan, Giordania, Arabia Saudita e Filippine (Petzoldt et al., 2022; Romero Teieda et al., 2022; Weber et al., 2022, 2023). Petzoldt et al. (2022) hanno riportato una maggior incidenza in animali a lunga vita (i.e., ovaiole e riproduttori), con una possibile associazione con cali dell'ovodeposizione. Un'infezione sperimentale condotta per indagare la patogenicità dell'isolato D2860, appartenente a GVIII-2, non ha prodotto alcuna sintomatologia (Molenaar et al., 2024), e l'effettivo impatto clinico di tale *lineage* risulta tuttora non chiarito. A causa dell'elevata diversità genetica rispetto ai *lineage* più comunemente indagati, la presenza di ceppi IB80-like non risulta rilevabile con molte delle metodiche di biologia molecolare frequentemente utilizzate per la diagnosi e la caratterizzazione di IBV. La necessità di mettere a punto e implementare saggi molecolari dedicati e le sue implicazioni in termini di costi, logistica e di interpretazione del dato hanno sinora complicato l'esecuzione di approfondimenti epidemiologici, impedendo l'accertamento della presenza (o assenza) di IB80 in molti paesi, inclusa l'Italia. L'obiettivo del presente contributo è stato quello di ricercare la presenza di ceppi IB80-like sul territorio italiano attraverso la validazione e l'implementazione di una metodica di RT-PCR specifica per il genotipo GVIII.

## **MATERIALI E METODI**

La presenza di ceppi IB80-like è stata investigata con una metodica di RT-PCR *in-house* specifica per il genotipo GVIII, basata su una coppia di primer disegnata a partire dalle sequenze del gene S1 di ceppi GVIII disponibili in GenBank. Le analisi sono state svolte con il kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Successivamente alla validazione, tale saggio è stato utilizzato nell'ambito delle attività di ricerca svolte presso il Laboratorio di Microbiologia e Malattie Infettive del Dipartimento MAPS dell'Università di Padova (Legnaro, Italia) per valutare l'epidemiologia di IBV, come

parte di un pannello di metodiche selezionate sulla base del contesto epidemiologico e delle vaccinazioni adottate. Alla luce del potenziale tropismo e maggior impatto dimostrato dai ceppi IB80-like per le tipologie produttive a lunga vita (Petzoldt et al., 2022), la metodica GVIII-specifica è stata utilizzata per analizzare tutti i campioni provenienti da allevamenti di ovaiole e riproduttori, che consistevano in pool di tamponi tracheali o cloacali. Nel caso venissero riscontrati risultati positivi, la porzione del genoma amplificata, lunga 676 nucleotidi e compresa tra la posizione 673 e 1348 del gene S1, è stata poi sequenziata con metodo Sanger presso i laboratori MacroGen Europe (Milano, Italia) utilizzando entrambi i primer. La visualizzazione e il *trimming* dei cromatogrammi sono stati operati con *FinchTV* (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA), e le sequenze consenso sono state generate con *ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australia). Le successive analisi filogenetiche sono state svolte in MEGAX (Kumar et al., 2018).

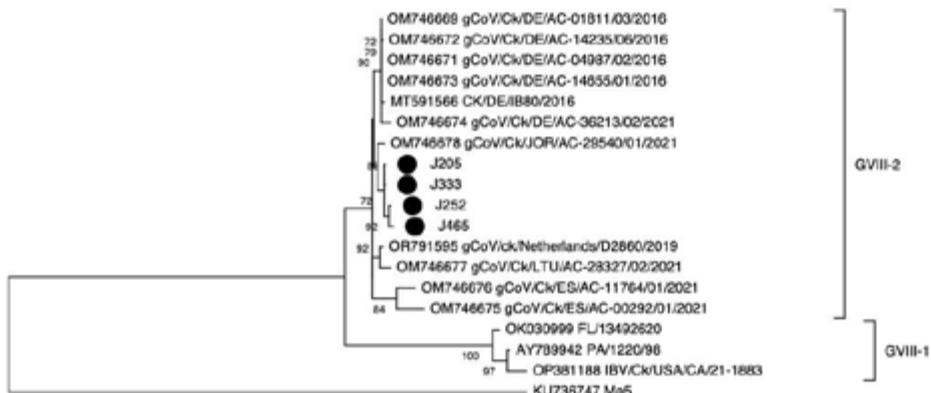
## RISULTATI

Durante il mese di aprile 2024, la metodica GVIII-specifica ha evidenziato quattro positività in allevamenti di ovaiole in Veneto, Lombardia ed Emilia-Romagna. I dati anamnestici relativi ai gruppi positivi sono riportati in Tabella 1.

Identificativo	Provincia	Età (settimane)	Tipologia campione	Anamnesi
J205	Mantova	37	Tamponi cloacali	Sintomi respiratori
J252	Verona	21	Tamponi tracheali	Nessun sintomo
J333	Bologna	50	Tamponi tracheali	Nessun sintomo
J465	Mantova	29	Tamponi tracheali	Calo ovodeposizione

**Tabella 1.** Dati anamnestici relativi agli allevamenti risultati positivi alla ricerca di ceppi IB80-like.

I quattro ceppi italiani erano contraddistinti da un'identità generica compresa tra il 98.75% e il 99.70%. L'esecuzione di una ricerca BLAST (Altschul et al., 1990) ha evidenziato l'esistenza in GenBank di 20 sequenze con una percentuale di identità superiore all'80%, di cui 14 con un *coverage* completo della porzione del gene S1 amplificata (Figura 1).



**Figura 1.** Albero filogenetico illustrante le relazioni filogenetiche tra i ceppi IB80-like sequenziati nel presente studio (contrassegnati dal simbolo ●) e le sequenze appartenenti al genotipo GVIII reperibili in GenBank. La sequenza di un ceppo Mass (*lineage* GI-1) è stata inserita come *outlier*. L'albero è stato costruito con il modello di sostituzione T92+G, selezionato sulla base del *Bayesian information criterion (BIC)*, e 1000 repliche *bootstrap*. I valori di supporto nodale sono mostrati solo se uguali o superiori a 70.

I risultati delle analisi filogenetiche hanno permesso di determinare l'appartenenza delle quattro sequenze italiane al *lineage* GVIII-2, e in particolare ad una *clade* che comprendeva anche un ceppo identificato in Giordania (identità genetica compresa tra il 97.50 e il 98.12%). L'identità genetica con il ceppo IB80, appartenente ad una *clade* contenente solo sequenze tedesche, era invece compresa tra il 96.71 e il 97.34%.

## DISCUSSIONE

I risultati delle analisi filogenetiche hanno permesso di confermare la presenza di ceppi GVIII-2 in Italia. Nonostante si tratti della prima segnalazione in tal senso, tale novità epidemiologica è probabilmente da ascrivere al mancato (o limitato) utilizzo di metodiche in grado di rilevarli piuttosto che ad una loro recente introduzione nel nostro territorio.

Gli stipiti identificati hanno mostrato un'elevata identità reciproca, che ha permesso di definire una *clade* separata rispetto ai ceppi dello stesso *lineage* ritrovati in altre parti d'Europa. Curiosamente, la sequenza genetica più vicina è risultata provenire dalla Giordania, sebbene il basso numero di sequenze GVIII disponibili nei database pubblici limita le conclusioni epidemiologiche che si possono trarre dalla filogenesi.

Confermando quanto già segnalato nella letteratura attualmente disponibile (Petzoldt et al., 2022), i ceppi GVIII-2 sono stati identificati in gruppi di ovaiole, ma la possibilità che essi circolino anche in altri comparti produttivi risulta tuttora da indagare. Inoltre, la sintomatologia segnalata nei quattro allevamenti positivi

non è risultata univoca, con due gruppi di animali asintomatici, uno interessato da problemi respiratori e il rimanente da un calo dell'ovodeposizione. Conseguentemente, non è stato possibile confermare l'impatto clinico e produttivo dei ceppi identificati. Tali interrogativi, uniti all'effettiva entità della circolazione di ceppi GVIII-2 in Italia, richiederanno studi dedicati, auspicabilmente favoriti da questa prima segnalazione.

## CONCLUSIONI

La prima identificazione, qui riportata, di ceppi GVIII-2 in Italia risulta di grande rilevanza pratica, in quanto evidenzia la necessità di aggiornare gli approcci diagnostici attualmente utilizzati nei confronti di IBV a livello nazionale. Solo col ricorso a metodiche specifiche risulterà infatti possibile confermare la presenza (così come l'assenza) di tale *lineage*.

Il presente studio va tuttavia considerato solo il primo passo di una ricerca più ampia volta a chiarire i molti interrogativi che tuttora permangono su questo *lineage* emergente, tra cui la sua reale prevalenza, l'areale di circolazione e l'effettivo impatto clinico ed economico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and DJ Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
2. Chen Y, Jiang L, Zhao W, Liu L, Zhao Y, Shao Y, Li H, Han Z and S Liu. (2017). Identification and molecular characterization of a novel serotype infectious bronchitis virus (GI-28) in China. *Veterinary Microbiology*, 198: 108-115.
3. Jiang L, Zhao W, Han Z, Chen Y, Zhao Y, Sun J, Li H, Shao Y, Liu L and S Liu. (2017). Genome characterization, antigenicity and pathogenicity of a novel infectious bronchitis virus type isolated from south China. *Infection, Genetics and Evolution*, 54: 437-446.
4. Jordan B. Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. (2017). *Veterinary Microbiology* 206: 137-143.
5. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549.
6. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G and M Cecchinato. (2020). Infectious bronchitis virus evolution, diagnosis and control. *Veterinary Sciences*, 7: 79.
7. Ma T, Xu L, Ren M, Shen J, Han Z, Sun J, Zhao Y and S Liu. (2019). Novel genotype of infectious bronchitis virus isolated in China. *Veterinary Microbiology*, 230: 178-186.
8. Molenaar RJ, Dijkman R, Jorna I and JJ de Wit. (2024). Extensive genetic and biological characterization of infectious bronchitis virus strain D2860 of genotype GVIII. *Avian Pathology*, 15: 1-10.
9. Petzoldt D, Vogel N, Bielenberg W, Haneke J, Bischoff H, Liman M, Rönchen S., Behr KP and T Menke. (2022). IB80—a novel infectious bronchitis virus genotype (GVIII). *Avian Diseases*, 66: 291-298.
10. Romero Tejada A, De Herdt P, Koopman R, Fortin A, Drago A, Cecchettin K, Leardini S, Varotto M, Ormelli S and RJW Currie. (2022). Field screening

- for the detection of IB IB80 variant. In *Proceedings of the 10th International Symposium on Avian Viral Respiratory Diseases (AVRD)*. Utrecht, the Netherlands.
11. 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. *Infection, Genetics and Evolution*, 39: 349-364.
  12. Weber R, Uyttebroek E, Wojcieszak E and J Lembeck. (2022). Prevalence of infectious bronchitis virus variants in Germany, Poland and the Netherlands between 2019 and 2022. In *Proceedings of the 10th International Symposium on Avian Viral Respiratory Diseases (AVRD)*. Utrecht, the Netherlands.
  13. Weber R, Lembeck J, and E Uyttebroek. (2023). Prevalence of variants of the infectious bronchitis virus in different types of chickens in Belgium, Germany and the Netherlands. In *Book of abstracts of the XXII World Veterinary Poultry Association Congress*. Verona, Italy.

# ANALISI MOLECOLARI IN CORSO D'INFEZIONE DA ADENOVIRUS IN PSITTACIDI EVIDENZIANO LA CIRCOLAZIONE DI NUOVI TIPI VIRALI E AMPIA VARIABILITÀ GENETICA

Lizzi G.<sup>1</sup>, Fasana S.<sup>2</sup>, Grilli G.<sup>2</sup>, Quaglia G.<sup>1</sup>, Pedrazzoli S.<sup>1</sup>, Graziosi G.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>, Musa L.<sup>2</sup>, Rapi M.C.<sup>2</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> *Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università di Milano, Via dell'Università 6, Lodi 26900, Italia*

## Summary

A PCR survey was conducted in an Italian amateur parrot breeding facility to investigate the circulation of adenoviruses and their molecular characteristics. Eighty psittacine birds, representing seven different parrot species, were sampled by cloacal swabs and fifteen livers were collected from deceased specimens. Out of 95 samples collected, 72 tested positive by a universal PCR targeting the pol gene, for *Adenoviridae* family, with a prevalence rate of 75.8%. All seven psittacine species tested positive for at least one adenovirus genus; for the first time an adenovirus was detected in the hooded parrot (*Psephotellus dissimilis*). Sequence and phylogenetic analysis of positive samples revealed the presence of psittacine adenovirus 2 in 57 samples, duck adenovirus 1 in 7 samples and psittacine adenovirus 5 in 2 samples. The adenoviruses detected in the remaining six positive samples exhibited low nucleotide and amino acid identity with sequences currently available in the GenBank® database, indicating the presence of unclassified adenovirus types. Further investigations are needed to better understand the pathological role of adenovirus in psittacine birds.

## INTRODUZIONE

Tra le malattie trasmissibili che colpiscono gli psittacidi allevati in cattività, le infezioni virali sono piuttosto frequenti e di difficile controllo (Kato et al., 2010). Fra queste, quelle da adenovirus (AdVs) causano infezioni prevalentemente subcliniche (Athukorala et al., 2021) o con sintomatologia non specifica (Hulbert et al., 2015). La presenza di AdVs è stata associata a lesioni agli organi interni ed all'apparato respiratorio (Wellehan et al., 2009; Yang et al., 2019).

Gli adenovirus presentano un capsido icosaedrico e sono caratterizzati da un genoma di DNA lineare a doppio filamento di 25-48 kb di lunghezza (Benkő et al., 2022). La famiglia *Adenoviridae* include sei generi. Virus appartenenti ai generi *Atadenovirus*, *Aviadenovirus* e *Siadenovirus* sono riportati in tutto il mondo negli uccelli domestici e selvatici (Fitzgerald 2020).

Alcuni AdVs aviari sono patogeni primari, quali il virus dell'enterite emorragica del tacchino (Rautenschlein et al., 2020), il virus della bronchite del colino della Virginia (Reed e Jack 2020) e il virus della sindrome del calo dell'ovodeposizione (Smyth 2020). Altri, come precedentemente detto, causano infezioni subcliniche che possono manifestarsi clinicamente in presenza di fattori stressanti o co-infezioni con virus immunosoppressivi (Mori et al., 1989; Phalen et al., 2019; Yang et al., 2019). Nel presente studio è stato campionato un allevamento amatoriale di psittacidi con

l'obiettivo di svolgere una indagine molecolare sulla circolazione di adenovirus, mediante PCR ed analisi di sequenza.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamento di psittacidi e campionamento*

Lo studio è stato condotto in un allevamento amatoriale di psittacidi situato nella provincia di Como. Al momento del campionamento, ottanta pappagalli erano ospitati a coppie o gruppi in gabbie o voliere di varie dimensioni. Le sette specie allevate erano: inseparabile facciarosa (*Agapornis roseicollis*), kakariki fronte rossa (*Cyanoramphus novaezelandiae*), parrocchetto di Bourke (*Neopsephotus bourkii*), calopsitta (*Nymphicus hollandicus*), pappagallo monaco (*Psephotellus dissimilis*), parrocchetto dal groppone rosso (*Psephotus haematonotus*) e parrocchetto dal collare (*Psittacula krameri*).

In totale sono stati raccolti 95 campioni, 80 tamponi cloacali dai soggetti in vita e 15 campioni di fegati da soggetti rinvenuti morti nel periodo gennaio-agosto 2022. I campioni sono stati conservati a  $-22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  fino al momento della processazione.

### *Processazione dei campioni ed estrazione del DNA*

Il DNA è stato estratto dal surnatante ottenuto dopo immersione dei tamponi cloacali in 400  $\mu\text{l}$  di soluzione sterile di fosfato tamponato (PBS) 1X e da 25 mg di campioni di fegato sottoposti ad omogeneizzazione, utilizzando il kit commerciale NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germania) e seguendo le indicazioni della casa produttrice.

### *Nested PCR per AdVs e sequenziamento*

Il DNA estratto è stato testato per adenovirus utilizzando il protocollo di nested PCR descritto da Wellehan et al., (2004) e disegnato sul gene *pol*. Gli amplificati ottenuti sono stati purificati utilizzando l'enzima ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) e successivamente sequenziati presso MacroGen Europe (Milano, Italia).

### *Analisi di sequenza e analisi filogenetica*

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state identificate utilizzando il tool di omologia BLAST (Johnson et al., 2008) sul portale NCBI (National Center for Biotechnology Information). In seguito, sono state assemblate utilizzando il software Bioedit Sequence Alignment Editor, versione 7.2.5.0 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA), quindi allineate e confrontate, utilizzando il software Clustal W (Thompson et al., 1994), con sequenze omologhe presenti nel database GenBank®. Infine, utilizzando l'algoritmo Maximum Likelihood in MEGA X (Kumar et al., 2018) è stata eseguita l'analisi filogenetica. I valori di bootstrap, ottenuti con 1000 replicati, sono stati considerati significativi quando uguali o superiori a 70 (Hillis e Bull 1993).

## **RISULTATI**

I risultati della nested PCR condotta sui tamponi cloacali sono mostrati nella Tabella 1. La presenza di adenovirus è stata rilevata in 63 campioni, con una prevalenza del 78,8%. L'analisi di sequenza ha permesso caratterizzare 61 adenovirus a livello di genere e tipo:

- PsAdV-2 (psittacine adenovirus 2) (53/63);
- PsAdV-5 (psittacine adenovirus 5) (2/63);
- DAdV-1 (duck adenovirus 1) (6/63).

Mentre non è stato possibile classificare due adenovirus evidenziati in due parrocchetti dal groppone rosso, per la loro scarsa identità nucleotidica con le sequenze di riferimento dei tipi di adenovirus sino ad oggi conosciuti

Specie campionate	N° animali	AdVs PCR positivi	Classificazione				
				N°	% positività	<i>Siadenovirus</i>	
				PsAdV-2	PsAdV-5	DAdV-1	
<i>Agapornis roseicollis</i>	14	9	64.3%	6	2	1	-
<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	41	38	92.7%	37	-	1	-
<i>Nymphicus hollandicus</i>	12	7	58.3%	5	-	2	-
<i>Psephotellus dissimilis</i>	3	3	100%	3	-	-	-
<i>Psephotus haematonotus</i>	4	3	75%	1	-	-	2
<i>Psittacula krameri</i>	6	3	50%	1	-	2	-
totale	80	63	78.8%	53 (84.1%)	2 (3.2%)	6 (9.5%)	2 (3.2%)

**Tabella 1.** Risultati della nested PCR condotta sui tamponi cloacali e classificazione basata su BLAST.

I risultati della nested PCR eseguita su campioni di fegato sono riportati in Tabella 2. Nove su quindici (60%) campioni sono risultati positivi ad adenovirus. L'analisi di sequenza ha permesso di classificarne 5/9:

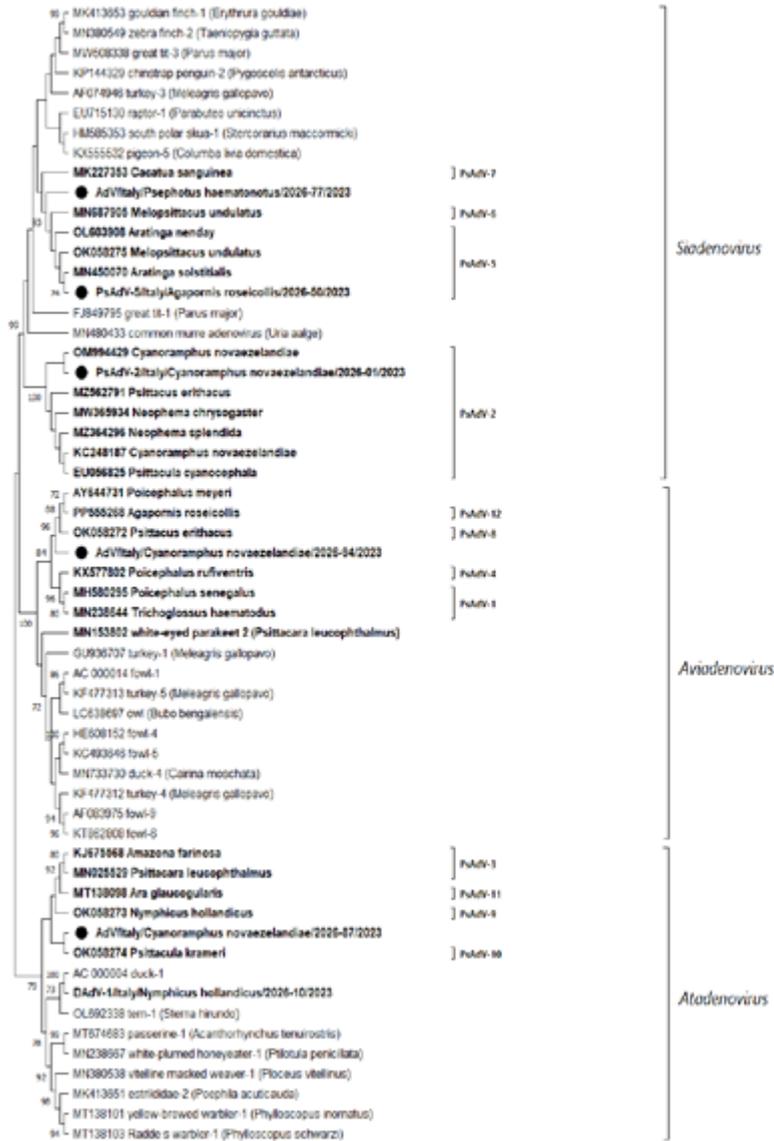
- PsAdV-2 (4/9)
- DAdV-1 (1/9)

Analogamente a quanto riscontrato durante la classificazione dei virus evidenziati nei tamponi cloacali, per la loro scarsa identità nucleotidica con le sequenze di riferimento dei tipi di adenovirus conosciuti, non è stato possibile classificare 4 degli adenovirus evidenziati da fegati di parrocchetti di Bourke e kakariki fronte rossa

Specie campionate	N° animali	AdVs PCR positivi	Classificazione				
				N°	% positività	<i>Siadenovirus</i>	
				PsAdV-2	DAdV-1		
<i>Agapornis roseicollis</i>	2	1	50%	-	1	-	-
<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	9	6	66.7%	3	-	-	3
<i>Neopsephotus bourkii</i>	2	2	100%	1	-	-	1
<i>Psephotellus dissimilis</i>	1	0	-	-	-	-	-
<i>Psittacula krameri</i>	1	0	-	-	-	-	-
totale	15	9	60%	4 (44.4%)	1 (11.2%)	-	4 (44.4%)

**Tabella 2.** Risultati della nested PCR condotta sui fegati e classificazione basata su BLAST.

L'analisi filogenetica ha confermato la classificazione ottenuta mediante analisi di sequenza e assegnato il genere ai virus non tipizzati all'analisi di sequenza (Figura 1).



**Figura 1.** Albero filogenetico basato su sequenze nucleotidiche parziali del gene pol di adenovirus ottenute in questo studio (contrassegnate da un cerchio e selezionate uno per cluster), ceppi di riferimento di AdVs di psittacidi (in grassetto) e ceppi di riferimento non di psittacidi recuperati da GenBank®. Tipi e generi sono indicati a destra dell'albero. Vengono riportati solo i valori di bootstrap  $\geq 70$ .

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Questo studio riporta per la prima volta la caratterizzazione molecolare di adenovirus circolanti in psittacidi allevati in Italia. I risultati hanno mostrato elevata prevalenza virale ed eterogeneità genetica.

Tutte le specie di psittacidi presenti in allevamento sono risultate positive ad almeno un adenovirus, nello specifico ai tipi PsAdV-2 e PsAdV-5 (genere *Siadenovirus*) o al tipo DAdV-1 (genere *Atadenovirus*).

Sono stati evidenziati inoltre AdVs non classificabili nei tipi sino ad oggi conosciuti; per ottenere una classificazione definitiva sarà necessario il sequenziamento dell'intero genoma ed eventualmente l'isolamento virale.

Ulteriori studi saranno necessari per comprendere quale ruolo patogeno giocano gli adenovirus negli psittacidi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Athukorala A, Phalen DN, Das A, Helbig KJ, Forwood JK, Sarker S. Genomic characterisation of a highly divergent Siadenovirus (Psittacine Siadenovirus F) from the critically endangered orange-bellied parrot (*Neophema chrysogaster*). *Viruses*. 2021;13(9):1714.
2. Benkő M, Aoki K, Arnberg N, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae. *J Gen Virol*. 2022;103(3):001721.
3. Fitzgerald SD. Adenovirus Infections - Introduction. In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2020. p. 321-2.
4. Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol*. 1993;42(2):182-92.
5. Hulbert CL, Chamings A, Hewson KA, Steer PA, Gosbell M, Noormohammadi AH. Survey of captive parrot populations around Port Phillip Bay, Victoria, Australia, for psittacine beak and feather disease virus, avian polyomavirus and psittacine adenovirus. *Aust Vet J*. 2015;93(8):287-92.
6. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Res*. 2008;36.
7. Katoh H, Ogawa H, Ohya K, Fukushi H. A review of DNA viral infections in psittacine birds. *J Vet Med Sci*. 2010;72(9):1099-106.
8. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-9.
9. Mori F, Tsuchi A, Suwa T, Itakura C, Hashimoto A, Hirai K. Inclusion bodies containing adenovirus-like particles in the kidneys of psittacine birds. *Avian Pathol*. 1989;18(1):197-202.
10. Phalen DN, Agius J, Vaz FF, Eden JS, Setyo LC, Donahoe S. A survey of a mixed species aviary provides new insights into the pathogenicity, diversity, evolution, host range, and distribution of psittacine and passerine adenoviruses. *Avian Pathol*. 2019;48(5):437-43.
11. Rautenschlein S, Mahsoub HM, Fitzgerald SD, Pierson FW. Adenovirus infections – Hemorrhagic enteritis and related infections. In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2020. p. 339-48.
12. Reed WM, Jack SW. Adenovirus infections – Quail bronchitis. In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2020. p. 348-52.
13. Smyth JA. Adenovirus infections – Atadenovirus (Egg drop syndrome of chick-

- ens and related infections). In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2020. p. 332-9.
14. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-80.
  15. Wellehan JFX, Greenacre CB, Fleming GJ, Stetter MD, Childress AL, Terrell SP. Siadenovirus infection in two psittacine bird species. *Avian Pathol.* 2009;38(5):413-7.
  16. Wellehan JFX, Johnson AJ, Harrach B, Benkő M, Pessier AP, Johnson CM, et al. Detection and analysis of six lizard adenovirus by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. *J Virol.* 2004;78(23):13366-9.
  17. Yang N, McLelland J, McLelland DJ, Clarke J, Woolford L, Eden P, et al. Psittacid adenovirus-2 infection in the critically endangered orange-bellied parrot (*Neophema chrysogastor*): A key threatening process or an example of a host-adapted virus? *PLoS ONE.* 2019;14(2)

# NUOVI SISTEMI ANALITICI PER COMPRENDERE IL COMPLESSO EQUILIBRIO AVICOLO. UN CASO CLINICO PER CONDIVIDERE LE POTENZIALITÀ DEL SISTEMA

Tata A.<sup>1</sup>, Zacometti C.<sup>1</sup>, Massaro A.<sup>1</sup>, Leone A.<sup>1</sup>, Falappa S.<sup>2</sup>, Ceroni S.<sup>2</sup>, Catania S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Chimica Sperimentale, 36100 Vicenza, Italia*

<sup>2</sup>*Fileni Alimentare SPA, Località Cerrete Collicelli N° 8, 62011 Cingoli (MC), Italia*

<sup>3</sup>*Avian Medicine Laboratory, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, via Bovolino 1/C, 37060 Buttapietra, (VR), Italia*

## Summary

Untargeted metabolomic profiling, by ambient mass spectrometry and chemometric tools, has made a dramatic impact on human disease detection. In a similar vein, this study attempted the translation of this clinical human disease experience to farmed poultry for precise veterinary diagnosis. As a proof of principle, in this diagnostic/prognostic study, direct analysis in real time high resolution mass spectrometry (DART-HRMS) was used in an untargeted manner to analyze fresh tissues (abdominal fat, leg skin, liver, and leg muscle) of pigmented and non-pigmented broilers to investigate the causes of lack of pigmentation in an industrial poultry farm. Afterwards, statistical analysis was applied to the DART-HRMS data to retrieve the molecular features that codified for two broiler groups, i.e., properly pigmented and non-pigmented broilers. Higher abundance of oxidized lipids, high abundance of oxidized bile derivatives, and lower levels of tocopherol isomers (Vitamin E) and retinol (Vitamin A) were captured in non-pigmented than in pigmented broilers. In this study, the DART-HRMS system performed well in retrieving valuable chemical information from broilers that explained the differences between the two groups of broilers in absorption of xanthophylls and the subsequent lack of proper broiler pigmentation in affected broilers. The results suggest this technology could be useful in providing near real-time feedback to aid in veterinary decision-making in poultry farming.

## INTRODUZIONE

Nel settore avicolo, la gestione delle caratteristiche genetiche, ambientali e alimentari, facilitano la fornitura di grandi quantità di prodotti a basso costo, altamente standardizzati e ricchi in proteine.

La genetica dei polli broiler, polli da carne, è stabile e altamente efficace nel breve termine. Gli ingredienti del mangime per questi polli subiscono modifiche di prezzo in base alle fluttuazioni di mercato (Abo Ghanima et al., 2023) e questo porta ad un aumento del costo del mangime totale che può determinare la sostituzione di alcuni componenti nella razione. Mentre il rapporto energetico non subisce variazioni e l'ammontare totale di grassi, proteine e fibre è mantenuto costante, le frazioni dei principali nutrienti (grassi saturi, grassi polinsaturi, carboidrati etc.) può variare (Chrystal et al., 2020; Maharjan et al., 2021; Massuquetto et al., 2020; Wickramasuriya et al., 2021).

In alcuni casi, un controllo approssimativo di queste macro-categorie di nutrienti è insufficiente per scongiurare problemi intestinali che possono ledere il metabolismo energetico e influenzando la capacità di assorbimento intestinale (Adedokun e Olojede,

2019; Fanatico et al., 2008; Güz et al., 2022).

I cambiamenti dei nutrienti e altri fattori esogeni quali patogeni, tossine, alterazioni delle condizioni ambientali, possono alterare l'equilibrio fisiologico dell'animale e di conseguenza l'equilibrio omeostatico. In alcuni casi la persistenza di disordini metabolici non può essere compensata dai meccanismi di riequilibrio omeostatici messi in atto dall'animale stesso e ne consegue l'instaurazione di uno stato patologico persistente (Chrystal et al., 2020). Il collasso o le forti alterazioni del sistema omeostatico dell'animale possono determinare cambiamenti nel prodotto finito (pollo, carne, uova) e incidono sul ritorno economico del produttore.

L'approccio medico-veterinario si concentra su: i) dimostrare lo stato patologico, ii) evidenziarne la causa principale e iii) suggerire le condizioni corrette per ripristinare le condizioni omeostatiche desiderabili. I veterinari generalmente prescrivono farmaci mirati da aggiungere alle porzioni di mangime ma, nonostante questo approccio sia efficace per alcune problematiche (malattie infettive), sono necessarie nuove tecnologie per individuare le contromisure appropriate.

La maggior parte delle tecniche diagnostiche *in vitro* coinvolge saggi immunologici per determinare e quantificare l'analita e/o il biomarcatore e/o il potenziale patogeno ma alcune limitazioni di queste tecniche tradizionali come la cross-reattività, la bassa sensibilità, il range dinamico limitato, l'analisi di marker metabolici predefiniti, impone un cambiamento immediato del ritmo di allevamento che rende difficile preservare la normale produzione e i guadagni economici.

Gli impatti economici delle malattie non trattate nei sistemi di produzione del pollame sono variabili e non sempre risulta possibile determinare il danno economico ma si assume che se la crescita dei polli è rallentata si osserverà una perdita anche in termini economici (Jones et al., 2019). In questo scenario è necessario implementare interventi rapidi per ridurre le perdite e preservare la produzione e il ritorno economico (Jones et al., 2019).

Si può affermare che l'intercettazione rapida dei problemi metabolici è fondamentale e la necessità di questi metodi diagnostici veterinari rapidi e accurati nella produzione avicola pone nuove sfide per la medicina veterinaria di laboratorio.

La sostenibilità, la precisione e le tecnologie intelligenti saranno i pilastri degli allevamenti avicoli del futuro, nonostante il modello di allevamento di precisione (PLF) sia ancora alle prime fasi di sviluppo. Lo sviluppo di questo modello di allevamento di precisione (PLF) chiede l'applicazione sul campo di tecnologie intelligenti come i sistemi di allerta precoce di malattia (Zhuang et al., 2018) e l'alimentazione precisa (Girard et al., 2017).

Con l'avvento dei processi tecnologici di visualizzazione e degli algoritmi di machine learning, potrà essere possibile monitorare in tempo reale lo stato di salute del pollame prevenendo così focolai di malattie su larga scala (Zhuang et al., 2018). In contemporanea, l'alimentazione potrà prevenire la deplumazione e la denutrizione (Girard et al., 2017) e darà informazioni sul comportamento alimentare (Aydin e Berckmans, 2016). Recenti studi di ambient mass spectrometry nell'ambito della diagnostica umana (King et al., 2023) pongono le basi per un'applicazione simile in medicina veterinaria (Pozzato et al., 2020; Tata et al., 2021; Zacometti et al., 2023).

I metodi basati sulla ambient mass spectrometry consentono un'analisi specifica di biomarcatori con adeguata rapidità e alta sensibilità (Ifa e Eberlin, 2016). Il termine ambient mass spectrometry si riferisce a una varietà di tecniche ionizzanti che richiedono

una preparazione del campione minima o nulla e sono caratterizzate da accoppiamento diretto agli spettrometri di massa nell'aria atmosferica (Clendinen et al., 2019).

In questo contesto, l'analisi metabolomica dei tessuti umani mediante l'ambient mass spectrometry fornisce utili informazioni le quali sono paragonabili alle informazioni dei tessuti animali, specialmente per quanto riguarda la rilevazione dei cambiamenti metabolici nelle fasi iniziali di una malattia.

Nella diagnosi clinica umana, i metodi di ambient mass spectrometry svolgono un ruolo importante nella diagnosi precoce (Ferreira et al., 2016), guidano la selezione della terapia (Porcari et al., 2018), monitorano la progressione della malattia (Johno et al., 2018) e orientano la terapia personalizzata (Bravo-Veyrat & Hopfgartner, 2022).

Recentemente, diversi sforzi sono stati fatti per tradurre in futuro i metodi di ambient mass spectrometry dalla ricerca alla clinica (Dehoog et al., 2023; Fiorante et al., 2024; Woolman et al., 2021; Zhang et al., 2021). Al di là della diagnostica umana (Woolman et al., 2021), piccoli tentativi sono stati fatti anche nell'ambito veterinario (Massaro et al., 2023; Tata et al., 2021b).

Questo risultato è stato possibile grazie all'applicazione congiunta della ambient mass spectrometry e dell'analisi statistica. L'analisi statistica multivariata permette di elaborare i complessi dati forniti dalla spettrometria di massa. La combinazione di spettrometria di massa e statistica permette di identificare i metaboliti alterati associati a una alterazione metabolica patologica e può rispondere alla domanda diagnostica del medico o del veterinario. In altre parole, i metodi di analisi statistica possono individuare i metaboliti discriminanti che caratterizzano tipi di tessuti malati in termini di variazioni delle piccole molecole legate a cascate metaboliche alterate (Katz et al., 2021).

Sfruttando la stretta connessione tra le alterazioni del metabolismo e lo sviluppo delle malattie, l'ambient mass spectrometry accoppiata all'analisi statistica sta avendo un impatto significativo sul rilevamento delle malattie umane. Sulla stessa lunghezza d'onda, questo studio pilota, focalizzato sulla rapida risoluzione di una carenza di assorbimento del pigmento nei polli broiler di un'azienda avicola ben consolidata in Italia, ha mostrato l'utilità della ambient mass spectrometry nel monitoraggio dei dismetabolismi legati a mutamenti dell'alimentazione.

La maggior parte dei consumatori e di conseguenza anche i distributori al dettaglio su larga scala, preferisce la carne di pollame pigmentata perché deducono che il colore indichi uno stato di salute ottimale (Sunde, 1992).

L'aggiunta di pigmenti naturali, come xantofille (carotenoidi naturali con attività di vitamina A) nel mangime, è una pratica comune nell'industria avicola.

Le xantofille responsabili della pigmentazione industriale delle avicole sono la luteina e la zeaxantina (entrambi carotenoidi), estratti dai petali del fiore di *Tagetes* e assorbiti nella loro forma libera (Hencken, 1992), mentre i grassi alimentari con gli acidi grassi saturi facilitano la bioaccessibilità delle xantofille attraverso la formazione di micelle miste (Gleize et al., 2013).

Gli animali assorbono questi pigmenti dalla loro dieta e, una volta ingeriti, i composti sono trasportati e accumulati nello strato adiposo sottocutaneo, nei muscoli pettorali, nei muscoli delle zampe, nella pelle e negli spazi tra le dita mentre il fegato immagazzina qualsiasi eccesso di xantofille.

L'efficienza di pigmentazione è determinata da quanto del carotenoide ingerito, viene assorbito dall'intestino e depositato nei tessuti bersaglio. Tale processo è generalmente ridotto negli avicoli da infezioni intestinali (Tyczkowski et al., 1991) o problemi di

stress ossidativo (Hencken, 1992).

L'obiettivo principale di questo studio è valutare la capacità dell'ambient mass spectrometry nell'individuare le cause del dismetabolismo che portano alla mancanza di pigmentazione. Lo studio ha permesso di risolvere rapidamente i problemi legati all'assorbimento delle xantofille e successivamente correggere la pigmentazione difettosa nei polli broiler in un allevamento avicolo situato nel Nord-Est dell'Italia.

## **MATERIALI E METODI**

### *Metabolomica mediante DART-HRMS dei tessuti*

Una quantità pari a 1g di ciascun tessuto omogeneizzato (adipe addominale pigmentato e non, pelle della coscia, fegato e muscoli della gamba di polli pigmentati e non pigmentati) è stato estratto utilizzando 10 ml di acetato di etile (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), agitato per 30 secondi e sonicato per 15 minuti.

Il campione estratto ottenuto è stato centrifugato per 5 minuti a 12000× g e 1 mL del supernatante è stato trasferito in un nuovo tubo di plastica.

L'analisi metabolomica degli estratti è stata eseguita utilizzando una sorgente DART SVP 100 (IonSense, Saugus, USA) accoppiata a uno spettrometro di massa Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Un volume di 5 µL di ciascun estratto è stato depositato su capillari di vetro inseriti in un autocampionatore Dip-it® (IonSense, Saugus, MA, USA). Successivamente, i capillari, con gli estratti essiccati all'aria, sono stati automaticamente spostati dall'autocampionatore a una velocità costante di 0,3 mm/s di fronte allo spettrometro di massa Orbitrap.

I parametri del DART e dell'analizzatore Orbitrap sono stati descritti precedentemente (Massaro et al., 2021). La risoluzione dello spettrometro di massa è stata settata a 70000 FWHI era 75-1125Da in modalità ionizzante positiva. È stata testata anche la modalità ionizzante negativa ma non ha fornito dati utili. Gli estratti sono stati analizzati in triplicato e gli spettri sono stati convertiti in formato .csv come descritto precedentemente (Tata et al., 2022). La ripetibilità dei tre spettri è stata testata tramite similarità del coseno. I valori m/z sono stati provvisoriamente assegnati interrogando il database online human metabolome database [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca), considerando un errore di massa ≤ 5 ppm.

### *Analisi statistica*

I dati ottenuti dall'analisi DART-HRMS sono stati pre-processati e analizzati statisticamente utilizzando il software statistico R 4.0.2 e il portale di statistica MetaboAnalyst 5.0. Gli isotopi degli ioni sono stati rimossi e gli spettri risultanti sono stati allineati utilizzando codici R sviluppati internamente.

Successivamente i dati sono stati filtrati in base al valore medio di intensità e normalizzati mediante trasformazione logaritmica in base 10 (log10). I dati del DART-HRMS pre-processati sono stati valutati mediante analisi statistica univariata. A tal fine, è stato costruito un vulcano plot per visualizzare i p-value risultanti dal test t non parametrico con valore p aggiustato per il tasso di falsi positivi (FDR) (-log10p) e fold-change (log2FC). Gli ioni con un p-value aggiustato inferiore a 0.05 e con un valore di FC maggiore di 2 o minore di 0.5 sono stati considerati statisticamente significativi.

## **RISULTATI**

### *Analisi metabolomica mediante DART-HRMS*

Una rapida analisi statistica univariata effettuata sui profili metabolici dei tessuti, ha

indicato differenze nell'abbondanza relativa di alcuni metaboliti tra broiler pigmentati e non pigmentati (Figure 2-5). Tra questi sono stati identificati alti livelli di  $\alpha$ -tocoferolo, acido arachidonico, acido stearico, acido oleico,  $\gamma$ -tocoferolo e  $\beta$ -tocoferolo, i quali sono considerati biomarcatori metabolici di pigmentazione sufficiente nel grasso addominale degli animali pigmentati (Figura 1) mentre la xantina, un prodotto del catabolismo delle purine, è stata identificata come biomarcatore del grasso addominale dei broiler non pigmentati. La pelle non pigmentata era caratterizzata da una maggiore abbondanza relativa dei seguenti metaboliti ossidati: 3-ossoundecanoilcarnitina, idrossipentadecanoilcarnitina (un marcatore di metabolismo lipidico alterato) (<https://hmdb.ca/Metabolites/HMDB0061641>) e dei monoacilgliceroli ossidati MG(18:1)-O e MG(18:3)-OH (Figura 2). Sono stati osservati anche alti livelli di menachinone (vitamina K2),  $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E), retinolo (vitamina A) e tirosil-metionina/metionil tirosina nella traccia metabolica dei fegati di broiler pigmentati rispetto a quelli non pigmentati (Figura 3). Nei fegati dei broiler non pigmentati, sono state rilevate elevate quantità di colecalciferolo disidratato (un derivato della vitamina D3), acidi biliari di-idrossi e tetraidrossi, acido fosfatidico ossidato (PA(42:2)-OH) e il marcatore di metabolismo lipidico alterato, 3-idrossiarachidonoylcarnitina (Figura 3). I profili metabolici dei muscoli delle zampe, nei broiler pigmentati, erano caratterizzati da un'alta abbondanza relativa di idrossi- $\alpha$ -tocoferolo,  $\gamma$ -tocoferolo, idrossi-sitocalciferolo (conosciuto anche come idrossi-vitamina d5) e idrossi- $\gamma$ -tocoferolo. D'altra parte, i diacilgliceroli idrossilati DG(36:4)-OH e DG(36:3)-OH sono stati assegnati come biomarcatori significativi dei muscoli delle zampe nei broiler non pigmentati (Figura 4). In sintesi, sono stati misurati alti livelli di tocoferolo antiossidante (vitamina E) nei tessuti degli animali pigmentati, elevati livelli di lipidi ossidati e vitamine A e K, così come derivati degli acidi biliari e della vitamina D nei tessuti dei broiler non pigmentati. Inoltre, biomarcatori carnitici responsabili di un metabolismo lipidico alterato sono stati osservati anche nel fegato e nella pelle delle zampe degli animali non pigmentati (tabella 1).

## DISCUSSIONE

Questo studio pilota presenta strategie innovative basate sulla metabolomica per l'implementazione e l'ottimizzazione dell'attività diagnostica applicata alla filiera avicola. Questo approccio diagnostico innovativo ha fornito risultati utili per gestire l'improvvisa comparsa di non pigmentazione della carne in un allevamento avicolo.

I profili metabolici dei quattro tessuti selezionati ha fornito indizi per comprendere l'eterogeneità della pigmentazione tra la popolazione di polli broiler e ha anche aiutato a: i) decifrare il possibile ruolo della dieta nella mancanza di assorbimento delle xantofille, ii) scoprire carenze metaboliche nei disturbi metabolici intestinali, e iii) risolvere il problema della pigmentazione.

Sono state osservate elevate abbondanze di lipidi ossidati, acidi biliari idrossilati e derivati basati sulla carnitina, nonché bassi livelli di antiossidanti come tocoferolo (Vitamina E) e retinolo (Vitamina A) nei tessuti dei polli non pigmentati.

Si può ipotizzare che le linee di alimentazione posizionate lungo l'intero capannone, non distribuiscano omogeneamente i grani più fini del mangime nella parte terminale del capannone i quali sono più soggetti all'ossidazione. Unitamente al comportamento gerarchico dei polli, alcuni animali potrebbero assumere una grande quantità di mangime non ossidato, mentre altri potrebbero ricevere una quantità inferiore che, associata all'ossidazione dei grani più fini, potrebbe causare adsorbimento delle

xantofille e quindi la decolorazione.

In sintesi, diversi livelli di assunzione di mangime ossidato, uniti alla gerarchia nutrizionale, sembrano aver determinato i diversi gradi di pigmentazione nella popolazione di polli broiler.

La valutazione dei risultati ha portato all'aggiunta di antiossidanti nella dieta dei polli, risolvendo così i problemi di pigmentazione nell'allevamento avicolo. È importante notare che, in questo caso specifico, l'analisi metabolica del fegato da sola avrebbe potuto fornire tutte le intuizioni formulate.

Lo studio ha fornito dati che hanno permesso alla direzione dell'allevamento di: i) aumentare la quantità di vitamina E somministrata per compensare l'ossidazione dei lipidi osservata nei tessuti, ii) valutare la possibilità di ripristinare l'uso dell'olio di girasole nel mangime, iii) migliorare il controllo della granulazione del mangime per prevenire l'ossidazione (i grani piccoli e fini ( $\leq 2$  mm) si ossidano più velocemente dei grani più grandi ( $> 2$  mm)), e iv) valutare l'uso di emulsionanti antiossidanti nel mangime.

Sulla base dei dati ottenuti e dei recenti cambiamenti nella formulazione del mangime (Jagtap et al., 2022), si ipotizza che la causa della mancanza di pigmentazione possa essere attribuita anche allo stress ossidativo legato al cambiamento dei componenti dell'olio nel mangime, che è passato dall'olio di girasole all'olio di soia.

La composizione della dieta è una causa ben nota di stress ossidativo (Desbruslais e Wealleans, 2022; Fellenberg e Speisky, 2006).

Il consumo di lipidi ossidati attraverso la dieta influisce negativamente sulle prestazioni dei polli broiler (Engberg et al., 1996), causando danni alle membrane, influenzando la morfologia della struttura intestinale e riducendo le capacità di assorbimento intestinale (Engberg et al., 1996; Englmaierová et al., 2011; Ruiz et al., 1999). La reazione dei radicali liberi con i PUFA innesca un processo a catena noto come perossidazione lipidica e l'irrancidimento degli alimenti (Lima & Abdalla, 2001). L'aggiunta di vitamina E migliora la stabilità del mangime (Mohiti-Asli e Ghanaatparast-Rashti, 2018). Come dimostrato in questo studio, l'integrazione dietetica di vitamina E ha significativamente ridotto l'ossidazione dei lipidi nei muscoli della coscia e del petto dei polli broiler alimentati con una dieta contenente olio di soia (Mohiti-Asli e Ghanaatparast-Rashti, 2018).

L'effetto antiossidante dei carotenoidi richiede la presenza di vitamina E nei tessuti (Ruiz et al., 1999). È stato studiato l'effetto del  $\beta$ -carotene e della vitamina E sulla stabilità ossidativa nella carne della coscia dei polli broiler alimentati con diverse tipologie di grassi, dimostrando che l'assorbimento dei carotenoidi è legato al tipo di grasso nella dieta e alla quantità di vitamina E.

La bioaccessibilità dei pigmenti naturali è facilitata dalla loro solubilizzazione nelle micelle ricche di acidi grassi saturi (Reboul E., 2019). Infatti, la bioaccessibilità dei carotenoidi è definita dalla percentuale di grassi saturi presenti nelle micelle miste (Molteni et al., 2022), quindi una dieta ricca di PUFA limita la solubilizzazione dei pigmenti naturali nelle micelle e il loro successivo assorbimento nel lume intestinale.

In futuro, questo metodo di controllo basato sulla metabolomica potrebbe permettere di monitorare continuamente il processo produttivo e potenzialmente generare modelli matematici per predire i risultati di produzione basati sui metaboliti predittivi.

Attualmente l'uso della ambient mass spectrometry nel settore avicolo è ancora nelle fasi iniziali di messa appunto e il metodo di controllo proposto è solo la prima applicazione nell'ambito diagnostico veterinario

L'introduzione della tecnica DART-HRMS nella produzione avicola potrebbe, direttamente dal fegato di alcuni uccelli, fornire potenziali avvisi di malattia e probabilmente favorire l'adeguamento preciso di uno squilibrio dietetico, riducendo l'uso di farmaci e ottimizzando le risorse.

Questo approccio diagnostico innovativo potrà fornire valutazioni di lipidi ossidati e vitamine in pochi secondi, potrà facilitare la gestione degli allevamenti in termini di tracciabilità e adattabilità durante l'intero processo di allevamento avicolo.

Il monitoraggio continuo dei polli da allevamento attraverso un approccio non mirato può fornire un quadro più completo dello stato complessivo di salute e benessere degli uccelli rispetto alla gestione individuale di ogni squilibrio dietetico e/o malattia e allo stesso tempo, avvisare gli allevatori in tempo reale all'insorgere dei problemi consentirebbe interventi rapidi e mirati che potrebbero beneficiare gli allevamenti interessati e correlati.

Da una prospettiva di sostenibilità, la diagnosi precoce basata sulla metabolomica mediante DART-HRMS faciliterebbe l'utilizzo efficiente delle risorse e supporterebbe una produzione avicola sostenibile.

Siamo consapevoli che questo studio sia solo uno studio pilota, ma è anche innegabile che potrebbe aprire una nuova strada nella diagnostica veterinaria. È fondamentale informare la comunità avicola circa la disponibilità di questo approccio diagnostico utilizzabile come attività complementare e di supporto alla diagnostica classica, tenendo presente che nelle popolazioni avicole, diversi fattori potrebbero contribuire a uno squilibrio metabolico. Sebbene l'approccio convenzionale rimanga molto utile, considerando la produzione avicola attuale e le sue esigenze, questo approccio metabolomico potrebbe rappresentare uno strumento prezioso per comprendere complessi squilibri dietetici.

In alcuni casi, i protocolli diagnostici convenzionali possono risultare insufficienti e il diagnosta può richiedere il supporto di approcci alternativi: utilizzando metodi basati sulla ambient mass spectrometry, i chimici potrebbero offrire un servizio di consulenza alle aziende agricole.

## **CONCLUSIONI**

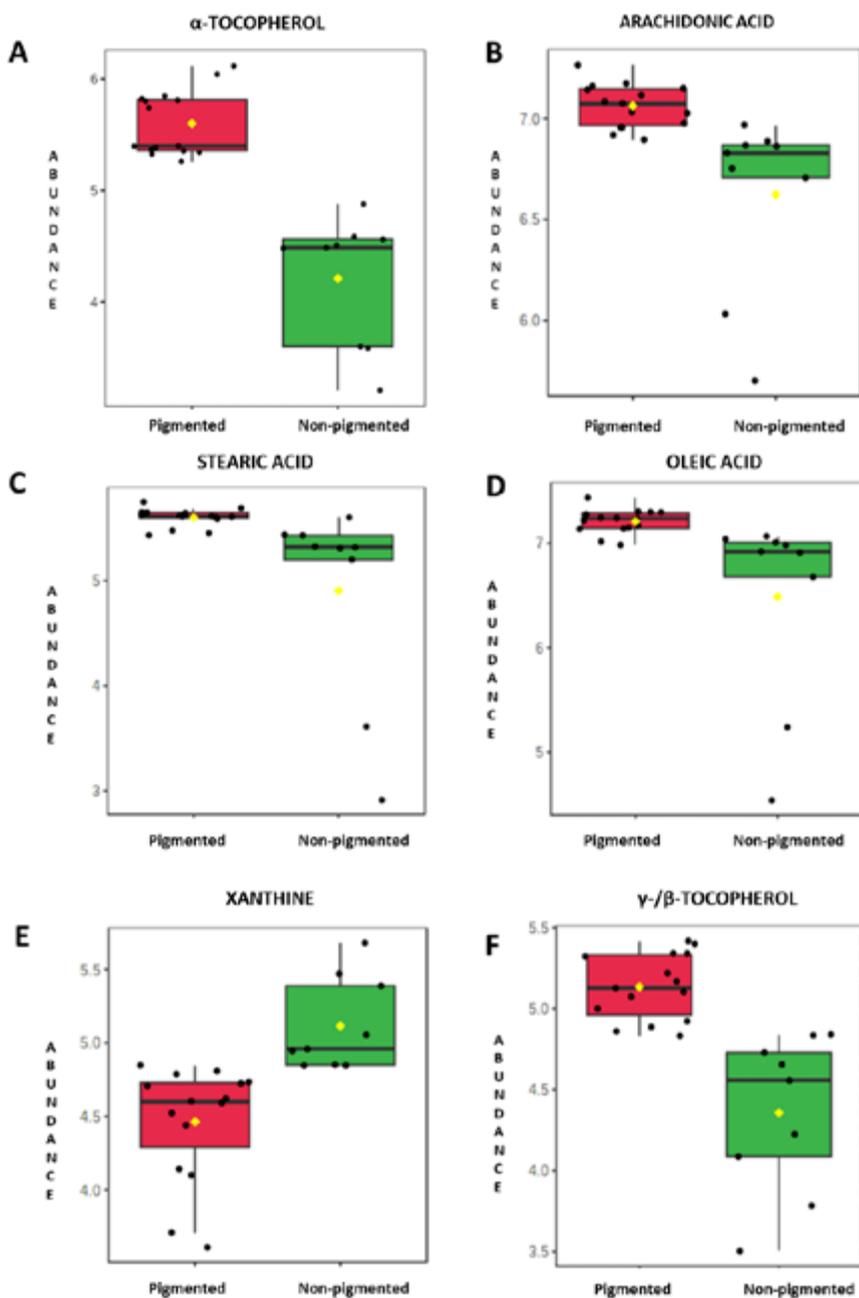
L'aggiunta di carotenoidi estratti nei mangimi per polli broiler permette di raggiungere il livello desiderato di pigmentazione che i consumatori moderni si aspettano.

L'efficienza della pigmentazione ottenuta da diversi mangimi arricchiti di carotenoidi rappresenta una preoccupazione dell'industria avicola.

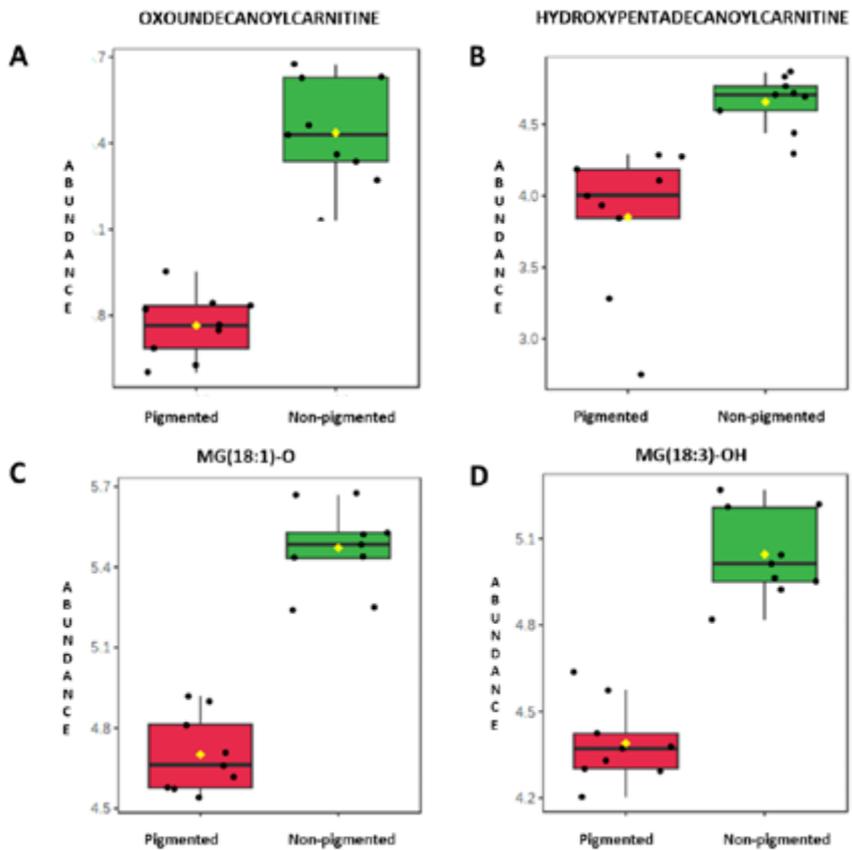
Per fornire all'industria avicola commerciale uno strumento per gestire i problemi di pigmentazione, i profili metabolici dei polli broiler non pigmentati, acquisiti in pochi minuti utilizzando DART-HRMS, sono stati confrontati statisticamente con quelli dei polli che mostrano una colorazione ottimale.

È stata riscontrata una maggiore abbondanza di lipidi ossidati, elevata presenza di derivati ossidati della bile e livelli più bassi di isomeri di tocoferolo (vitamina E) e retinolo (vitamina A) nei polli non pigmentati rispetto a quelli pigmentati. I risultati sperimentali hanno dimostrato che questo approccio integrato può svelare il complesso pattern di dati omici registrati dall'ambient mass spectrometry e fare luce sullo stato di salute, nonché sui disturbi metabolici e problemi alimentari legati a una pigmentazione sub-ottimale.

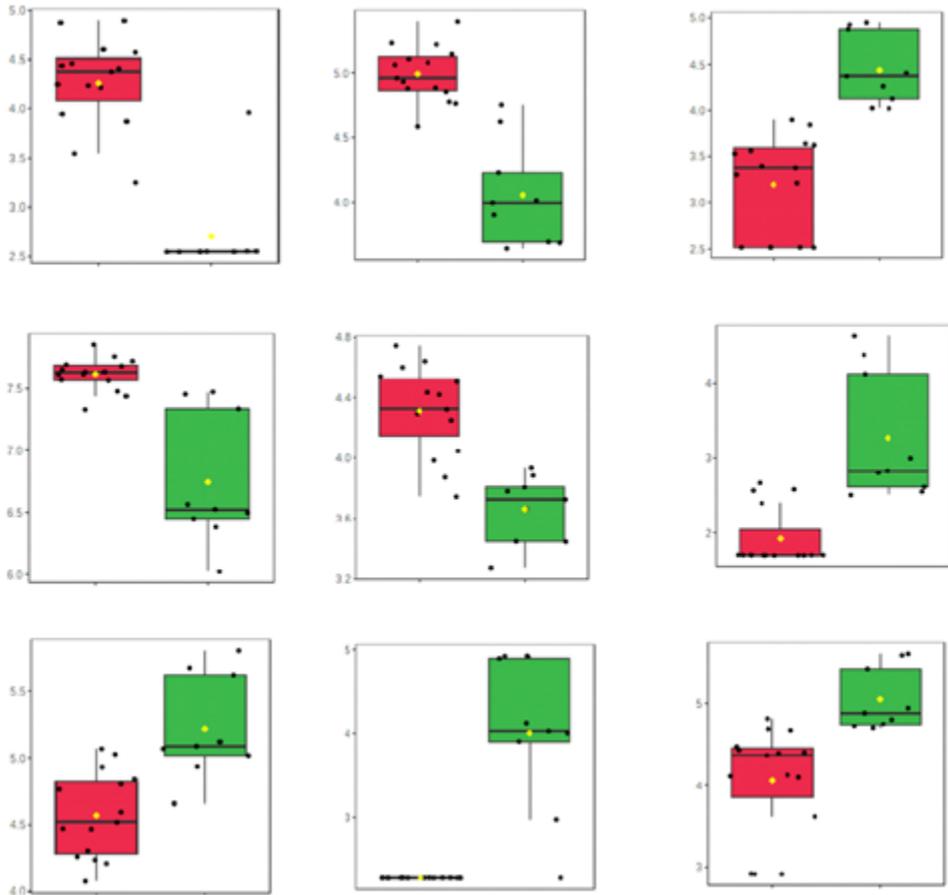
Questa ricerca può fornire un punto di riferimento per la valutazione dello stato di pigmentazione dei polli in futuro.



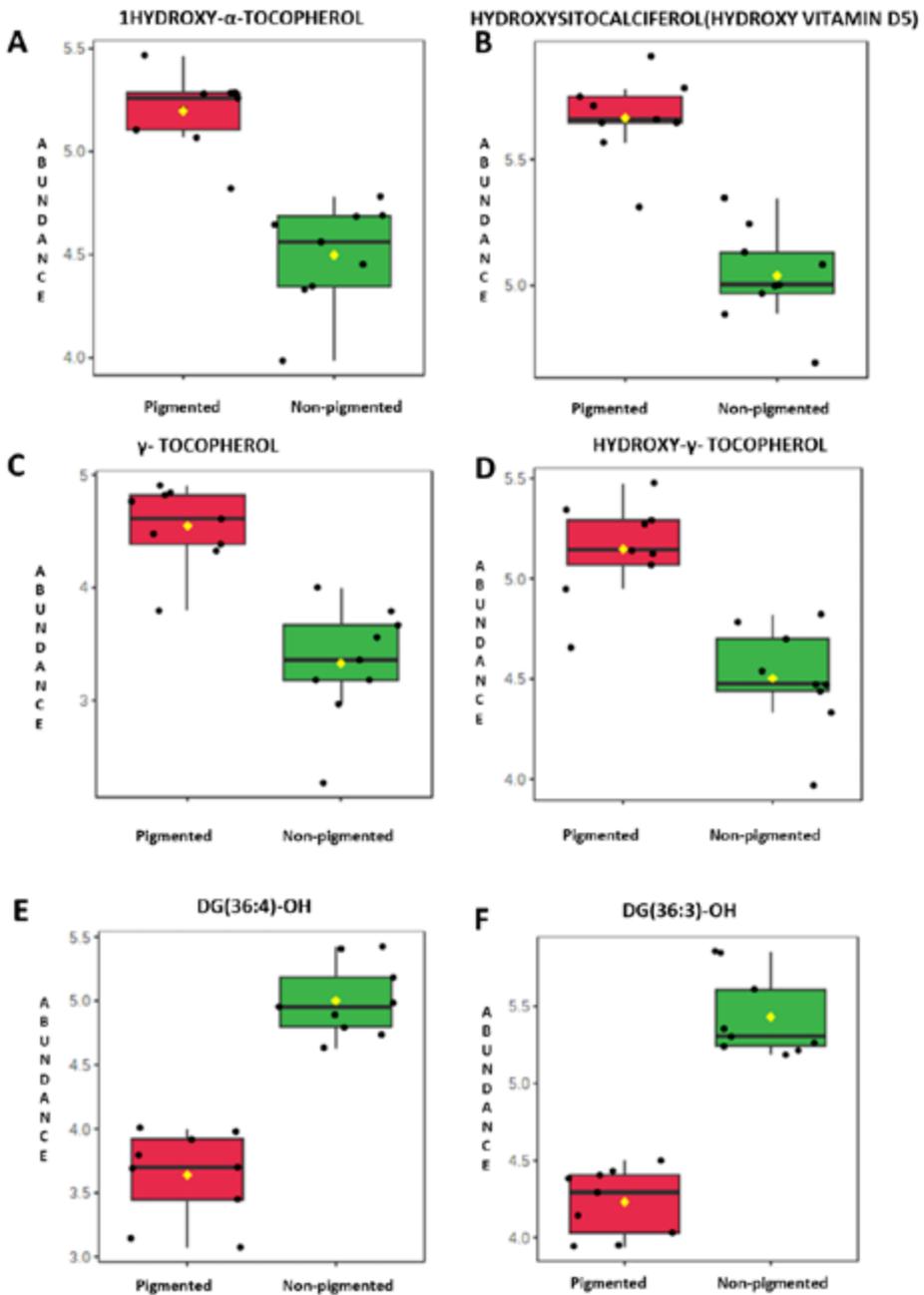
**Figura 1.** Box plot che mostrano l'intensità in log<sub>10</sub> dei metaboliti del grasso addominale che sono risultati statisticamente significativi dal volcano plot (p-value aggiustato  $\leq 0.05$  e fold-change  $>2$  o  $<0.5$ ). I box rossi rappresentano il grasso addominale dei tessuti pigmentati, i box verdi rappresentano il grasso addominale dei tessuti non pigmentati.



**Figura 2.** Box plot che mostrano l'intensità in  $\log_{10}$  dei metaboliti della pelle che sono risultati statisticamente significativi dal volcano plot ( $p$ -value aggiustato  $\leq 0.05$  e fold-change  $>2$  o  $<0.5$ ). I box rossi rappresentano la pelle dei tessuti pigmentati, i box verdi rappresentano la pelle dei tessuti non pigmentati.



**Figura 3.** Box plot che mostrano l'intensità in log10 dei metaboliti del fegato che sono risultati statisticamente significativi dal volcano plot ( $p$ -value aggiustato  $\leq 0.05$  e fold-change  $>2$  o  $< 0.5$ ). I box rossi rappresentano i fegati dei tessuti pigmentati, i box verdi rappresentano i fegati dei tessuti non pigmentati.



**Figura 4.** Box plot che mostrano l'intensità in log10 dei metaboliti del muscolo che sono risultati statisticamente significativi dal volcano plot ( $p$ -value aggiustato  $\leq 0.05$  e fold-change  $>2$  o  $< 0.5$ ). I box rossi rappresentano il muscolo dei tessuti pigmentati, i box verdi rappresentano il muscolo dei tessuti non pigmentati.

Tissue	$m/z$ observed by DART-HRMS	Theoretical $m/z$	Ion Assignment	Predicted molecular formula	Appm	Annotation	p-value adj	FC
Grasso addominale	170.0669	170.0672	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-1.76	xanthine	0.0038	0.2249
Grasso addominale	300.2891	300.2897	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	-1.99	oleic acid	0.0056	2.3575
Grasso addominale	302.3048	302.3054	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	-1.98	stearic acid	0.0056	2.1147
Grasso addominale	322.2736	322.2741	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	-1.55	arachidonic acid	0.0051	2.1015
Grasso addominale	417.3719	417.3727	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	-1.92	γ-/β-tocopherol	0.0038	4.3545
Grasso addominale	431.3877	431.3884	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	-1.62	α-tocopherol	0.0038	17.5860
Pelle	285.1689	285.1697	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>5</sub>	-2.81	oxoundecanoyl carnitine	0.0037	0.2038
Pelle	343.2470	343.2479	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>	-2.62	hydroxypentadecanoyl carnitine	0.0037	0.2151
Pelle	351.2524	351.2536	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	-3.41	MG(18:3)-OH	0.0037	0.2189
Pelle	371.2782	371.2792	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	-2.69	MG(18:1)-O	0.0037	0.1687
Fegato	269.2258	269.2270	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	-4.4	retinol (Vitamin A)	0.0111	3.9917
Fegato	285.0750	285.0757	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-2.46	dehydrated cholecalciferol (Vitamin D3 derivative)	0.0274	0.2011
Fegato	295.1114	295.1117	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	-1.01	tyrosyl methionine/methionyltyrosine	0.0156	4.8117
Fegato	464.3370	464.3370	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>5</sub>	0	3-hydroxyarachidonoylcarnitine	0.0152	0.1389
Fegato	424.3059	424.3057	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub>	0.49	dihydroxy bile acid (dihydroxy-12-oxocholanoic acid)	0.0183	0.0698
Fegato	427.3022	427.3001	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	4.9	menaquinone (Vitamin K2)	0.0220	20.571
Fegato	427.3234	427.3218	[M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	3.7	tetrahydroxy bile acid (dolicosterone)	0.0111	0.0058
Fegato	431.3868	431.3884	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	-3.7	α-tocopherol (Vitamin E)	0.0093	6.2415
Fegato	781.5763	781.5753	[M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>45</sub> H <sub>85</sub> O <sub>10</sub> P	1.28	PA (42:2)-OH	0.0153	0.0145
Muscolo	417.3730	417.3727	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	2.08	γ- tocopherol	0.0187	12.8660
Muscolo	429.3725	429.3727	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	-0.47	hydroxysitocalciferol(hydroxy Vitamin D5)	0.0187	4.1043
Muscolo	433.3669	433.3676	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	-1.61	hydroxy-γ- tocopherol	0.0340	4.3316
Muscolo	447.3828	447.3833	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>	-1.12	hydroxy-α-tocopherol	0.0187	4.7460
Muscolo	633.5084	633.5089	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>68</sub> O <sub>6</sub>	-0.78	DG(36:4)-OH	0.0047	0.0450
Muscolo	635.5260	635.5245	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>70</sub> O <sub>6</sub>	2.36	DG(36:3)-OH	0.0047	0.0581

**Tabella 1.** Elenco dei metaboliti più importanti osservati sia nei tessuti pigmentati che nei tessuti non pigmentati. I dati sono stati estrapolati dal volcano plot. Sono riportati il rapporto  $m/z$  osservato, il rapporto  $m/z$  teorico, l'assegnazione ionica, la formula elementare, l'errore ( $\Delta$ ppm), fold change (FC), p-value aggiustato ( $p$ -value<sub>adj</sub>). Sono riportati solo i metaboliti con valore di p-value aggiustato < 0.05.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abo Ghanima MM, Abd El-Hack ME, Al-Otaibi AM, Nasr S, Almohmadi NH, Taha AE, Jaremko M and NI El-Kasrawy. (2023). Growth performance, liver and kidney functions, blood hormonal profile, and economic efficiency of broilers fed different levels of threonine supplementation during feed restriction. *Poultry Science* 102(8): 1–8.
2. Adedokun SA and OC Olojede. (2019). Optimizing gastrointestinal integrity in poultry: The role of nutrients and feed additives. *Frontiers in Veterinary Science* 5: 348.
3. Antonelli G and S Cutler. (2016). Evolution of the Koch postulates: towards a 21st-century understanding of microbial infection. *Clinical Microbiology and Infection* 22(7): 583–584.

4. Araujo P, Nguyen TT, Frøyland L, Wang J, and JX Kang. (2008). Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 1212(1–2): 106–113.
5. Aydin A and D Berckmans. (2016). Using sound technology to automatically detect the short-term feeding behaviours of broiler chickens. *Computers and Electronics in Agriculture*, 121: 25–31.
6. Bragolusi M, Tata A, Massaro A, Zacometti C and R Piro. (2023). Nutritional labelling of food products purchased from online retail outlets: screening of compliance with European Union tolerance limits by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 31(2): 89–99.
7. Bravo-Veyrat S and G Hopfgartner. (2022). Mass spectrometry based high-throughput bioanalysis of low molecular weight compounds: are we ready to support personalized medicine? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(1): 181–192.
8. Bruce CR, Hoy, AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA and EW Kraege. (2009). Overexpression of carnitine palmitoyl-transferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 58(3): 550–558.
9. Carreras I, Castellari M, García Regueiro JA, Guerrero L, Esteve-García E and C Sárraga. (2004). Influence of enrofloxacin administration and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplemented diets on oxidative stability of broiler tissues. *Poultry Science* 83(5): 796–802.
10. Clendinen CS, Monge MA and FM Fernández. (2019). Ambient Mass Spectrometry in Metabolomics. *HSS* 43(2): 133–160.
11. Chrystal PV, Moss AF, Khoddami A, Naranjo VD, Selle PH and SY Liu. (2020). Effects of reduced crude protein levels, dietary electrolyte balance, and energy density on the performance of broiler chickens offered maize-based diets with evaluations of starch, protein, and amino acid metabolism. *Poultry Science* 99(3): 1421–1431.
12. Dambrova M, Makrečka-Kuka M, Kuka J, Vilskersts R, Nordberg D, Attwood MM, Smesny S, Sen ZD, Guo, AC, Oler E, Tian S, Zheng J, Wishart DS, Liepinsh E and HB Schiöth. (2022). Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacological Reviews* 74(3): 506–551.
13. Dehoog RJ, King ME, Keating MF, Zhang J, Sans M, Feider CL, Garza KY, Bensussan A, Krieger A, Lin JQ, Badal S, Alore E, Pirko C, Brahmabhatt K, Yu W, Grogan R, Eberlin LS and J Suliburk. (2023). Intraoperative Identification of Thyroid and Parathyroid Tissues during Human Endocrine Surgery Using the MasSpec Pen. *JAMA Surgery* 158(10): 1050–1059.
14. Desbruslais A and AL Wealleans. (2022). Oxidation in Poultry Feed: Impact on the Bird and the Efficacy of Dietary Antioxidant Mitigation Strategies. *Poultry* 1(4): 246–277.
15. Engberg RM, Lauridsen C, Jensen SK and K Jakobsen. (1996). Inclusion of Oxidized Vegetable Oil in Broiler Diets. Its Influence on Nutrient Balance and on the Antioxidative Status of Broilers. *Poultry Science*, 75(8): 1003–1011.
16. Englmaierová M, Bubancová I, Vít T and M Skøivan. (2011). The effect of lycopene and vitamin E on growth performance, quality and oxidative stability of

- chicken leg meat. *Czech Journal of Animal Science* 56(12): 536–543.
17. Fanatico AC, Pillai PB, Hester PY, Falcone C, Mench JA, Owens CM and JL Emmert. (2008). Performance, livability, and carcass yield of slow- and fast-growing chicken genotypes fed low-nutrient or standard diets and raised indoors or with outdoor access. *Poultry Science* 87(6): 1012–1021.
  18. Fellenberg MA and H Speisky, H. (2006). Antioxidants: Their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal* 62(1): 53–70.
  19. Ferreira CR, Yannell KE, Jarmusch AK, Pirro V, Ouyang Z and R Graham Cooks. (2016). Ambient ionization mass spectrometry for point-of-care diagnostics and other clinical measurements. *Clinical Chemistry* 62(1): 99–110.
  20. Fiorante A, Ye LA, Tata A, Kiyota T, Woolman M, Talbot F, Farahmand Y, Vlamincq D, Katz L, Massaro A, Ginsberg H, Aman A and A Zarrine-afsar. (2024). A Workflow for Meaningful Interpretation of Classification Results from Handheld Ambient Mass Spectrometry Analysis Probes. *Int. J. Mol. Sci.* 25(6): 3491.
  21. Girard MTE, Zuidhof MJ, and CJ Bench (2017). Feeding, foraging, and feather pecking behaviours in precision-fed and skip-a-day-fed broiler breeder pullets. *Applied Animal Behaviour Science* 188: 42–49.
  22. Gleize B, Tourniaire F, Depezay L, Bott R, Nowicki M, Albino L, Lairon D, Kesse-Guyot E, Galan P, Hercberg S and P Borel. (2013). Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. *British Journal of Nutrition* 110(1): 1–10.
  23. Güz BC, de Jong, IC, Bol UE, Kemp B, van Krimpen M, Molenaar R and H van den Brand. (2022). Effects of organic macro and trace minerals in fast and slower growing broiler breeders' diet on offspring growth performance and tibia characteristics. *Poultry Science* 101(3).
  24. Hencken H. (1992). Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science* 71(4): 711–717.
  25. Ifa DR and LS Eberlin. (2016). Ambient ionization mass spectrometry for cancer diagnosis and surgical margin evaluation. *Clinical Chemistry* 62(1): 111–123.
  26. Jagtap S, Trollman H, Trollman F, Garcia-garcia G, Parra-Lopez C, Duong L, Martindale W, Munekata PES, Lorenzo JM, Hdaifeh A, Hassoun A, Salonitis K and M Afy-Shararah. (2022). The Russia-Ukraine conflict: Its implications for the global food supply chains. *Foods*, 11(14): 2098.
  27. Johno H, Yoshimura K, Mori Y, Kimura T, Niimi M, Yamada M, Tanigawa T, Fan J and S Takeda. (2018). Detection of potential new biomarkers of atherosclerosis by probe electrospray ionization mass spectrometry. *Metabolomics*, 14(4).
  28. Jones PJ, Niemi J, Christensen JP, Tranter RB, and RM Bennett. (2019). A review of the financial impact of production diseases in poultry production systems. *Animal Production Science* 59(9): 1585–1597.
  29. Katz L, Tata A, Woolman M and A Zarrine-Afsar. (2021). Lipid profiling in cancer diagnosis with hand-held ambient mass spectrometry probes: Addressing the late-stage performance concerns. *Metabolites* 11(10).
  30. King ME, Lin M, Spradlin M, and LS Eberlin. (2023). Advances and Emerging Medical Applications of Direct Mass Spectrometry Technologies for Tissue Analysis. *Annual Review of Analytical Chemistry* 16(1): 1–25.
  31. Korifi R, Le Dréau Y, Antinelli JF, Valls R and N Dupuy. (2013). CIEL\*a\*b\* color

- space predictive models for colorimetry devices - Analysis of perfume quality. *Talanta*, 104, 58–66.
32. Lima ES and DSP Abdalla. (2001). Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37(3): 293–303.
  33. Maharjan P, Martinez DA, Weil J, Suesuttajit N, Umberson C, Mullenix G, Hilton KM, Beitia A and CN Coon. (2021). Review: Physiological growth trend of current meat broilers and dietary protein and energy management approaches for sustainable broiler production. *Animal*, 15, 100284.
  34. Manilla HA and F Husvet. (1999). N-3 fatty acid enrichment and oxidative stability of broiler chicken. *Acta Aliment.* 3(3): 274–282.
  35. Massaro A, Stella R, Negro A, Bragolusi M, Miano B, Arcangeli G, Biancotto G, Piro R and A Tata. (2021). New strategies for the differentiation of fresh and frozen/thawed fish: A rapid and accurate non-targeted method by ambient mass spectrometry and data fusion (part A). *Food Control* 130.
  36. Massuquetto A, Panisson JC, Schramm VG, Surek D, Krabbe EL and A Maiorka. (2020). Effects of feed form and energy levels on growth performance, carcass yield and nutrient digestibility in broilers. *Animal* 14(6).
  37. Mohiti-Asli M and M Ghanaatparast-Rashti. (2018). Feeding antioxidant vitamin and vegetable oils to broilers: Vitamin E reduced negative effect of soybean oil on immune response and meat lipid oxidation. *Animal Production Science* 58(10): 1829–1836.
  38. Molteni C, La Motta C and F Valoppi. (2022). Improving the Bioaccessibility and Bioavailability of Carotenoids by Means of Nanostructured Delivery Systems: A Comprehensive Review. *Antioxidants* 11(10).
  39. Porcari AM, Zhang J, Garza KY, Rodrigues-Peres RM, Lin JQ, Young JH, Tibshirani R, Nagi C, Paiva GR, Carter SA, Sarian LO, Eberlin MN and LS Eberlin. (2018). Multicenter Study Using Desorption-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry Imaging for Breast-Cancer Diagnosis. *Analytical Chemistry* 90(19): 11324–11332.
  40. Pozzato N, Piva E, Pallante I, Bombana D, Stella R, Zanardello C, Tata A, and R Piro. (2020). Rapid detection of asperphenamate in a hay batch associated with constipation and deaths in dairy cattle. The application of DART-HRMS to veterinary forensic toxicology. *Toxicon* 187: 122–128.
  41. Reboul E. (2019). Mechanisms of Carotenoid Intestinal Absorption: Where Do we stand? *Nutrients* 11(4): 838.
  42. Ruiz JA, Pérez-Vendrell AM and E Esteve-García. (1999). Effect of  $\beta$ -carotene and vitamin E on oxidative stability in leg meat of broilers fed different supplemental fats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 448–454.
  43. Sunde ML. (1992). The scientific way to pigment poultry products. Introduction to the symposium. *Poultry Science* 71(4): 709–710.
  44. Tata A, Massaro A, Riuzzi G, Lanza I, Bragolusi M, Negro A, Novelli E, Piro R, Gottardo F and S Segato. (2022). Ambient mass spectrometry for rapid authentication of milk from Alpine or lowland forage. *Scientific Reports* 12(1): 1–11.
  45. Tata A, Pallante I, Massaro A, Miano B, Bottazzari M, Fiorini P, Dal Prà M, Paganini L, Stefani A, De Buck J, Piro R and N Pozzato. (2021). Serum Metabolomic Profiles of Paratuberculosis Infected and Infectious Dairy Cattle by Ambient Mass Spectrometry. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 625067.

46. Tyczkowski JK, Hamilton PB and MD Ruff. (1991). Altered metabolism of carotenoids during pale-bird syndrome in chickens infected with *Eimeria acervulina*. *Poultry Science* 70(10): 2074–2081.
47. Wickramasuriya SS, Macelline SP, Cho HM, Hong JS, Patterson R and JM Heo. (2021). Multi-carbohydrase application into energy and amino acid deficient broiler diets: A strategy to enhance performance of broiler chickens. *Journal of Animal Science and Technology* 63(6): 1328–1343.
48. Woolman M, Katz L, Tata A, Basu SS and A Zarrine-Afsar. (2021). Breaking Through the Barrier: Regulatory Considerations Relevant to Ambient Mass Spectrometry at the Bedside. *Clinics in Laboratory Medicine* 41(2): 221–246.
49. Zacometti C, Tata A, Stella R, Leone S, Pallante I, Merenda M, Catania S, Pozzato N and R Piro. (2023). DART-HRMS allows the detection of toxic alkaloids in animal autopsy specimens and guides the selection of confirmatory methods in accidental plant poisoning. *Analytica Chimica Acta* 1264: 341309.
50. Zhang J, Sans M, Dehoog RJ, Garza KY, King ME, Feider CL, Bensussan A, Keating MF, Lin JQ, Povilaitis SC, Katta N, Milner TE, Yu W, Nagi C, Dhingra S, Pirko C, Brahmhatt KA, Van Buren G, Carter S, Thompson A, Grogan RH, Suliburk J and LS Eberlin. (2021). Clinical Translation and Evaluation of a Handheld and Biocompatible Mass Spectrometry Probe for Surgical Use. *Clinical Chemistry* 67(9): 1271–1280.
51. Zhuang X, Bi M, Guo J, Wu S, Zhang T. (2018). Development of an early warning algorithm to detect sick broilers. *Computers and Electronics in Agriculture* 144: 102–113.

# IMPIEGO DELLA FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY PER LA TIPIZZAZIONE DI *RIEMERELLA ANATIPESTIFER*

Zandonà L.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Cordovana M.<sup>2</sup>, Cordioli B.<sup>1</sup>, Guolo A.<sup>1</sup>, Garbuio M.<sup>1</sup>, Rizzardi A.<sup>1</sup>, Vedana M.<sup>1</sup>, Giroto E.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Treviso, vicolo Mazzini 4B, Fontane di Villorba TV

<sup>2</sup> Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Fahrenheitstrasse 4 28359 Bremen Deutschland DE

## Summary

*Riemerella anatipestifer* (RA) is an important bacterial pathogen in poultry industry causing significant economic losses due to mortality, therapeutic costs and decrease of zootechnical performances. Vaccination of poultry flocks with inactivated RA strains represents the most important method to control the disease and it relies on the accurate serotyping of the strains circulating in a farm/territory. Currently RA serotypes are distinguished by means of polyclonal rabbit sera, an expensive method involving the use of experimental rabbits.

For this reason, in this work we tested whether the Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FT-IR), an innovative phenotypic method, was able to characterize 43 RA strains, both reference and field strains, with known serotype. Reference strains were used to train the machine-learning algorithm included in the instrument to discriminate the serotypes of the field strains.

The FT-IR was able to distinguish RA strains, both reference and field strains, into clusters according to the different serotypes, confirming the results achieved with the traditional method. Particularly, serotypes 1, 3, 6, 13 and 18 could be clearly distinguished in the graphical elaboration of data.

Based on these results, FT-IR could overcome the need of experimental animals for producing diagnostic reagents. Also, it can be considered an innovative, rapid, economic and promising method for the characterization of avian bacterial pathogens in routine diagnostic laboratories.

## INTRODUZIONE

Le infezioni da *Riemerella anatipestifer* (RA) rappresentano un grave problema per gli allevamenti commerciali di tacchini e polli quali causa di incremento di mortalità, costi per la terapia antimicrobica, scarti alla macellazione e peggioramento delle performance zootecniche (Sandhu, 2008). Negli ultimi 10 anni abbiamo assistito ad una evoluzione dell'epidemiologia della malattia con il progressivo aumento dei episodi di riemerellosi sostenuti da ceppi di RA con sierotipo 1 e *sequence type* 46. Tali ceppi di RA circolanti negli allevamenti commerciali italiani hanno sostituito e soppiantato i differenti ed eterogenei sierotipi circolanti negli anni precedenti (Bano et al., 2020). La conoscenza del sierotipo è fondamentale per poter programmare e organizzare una strategia vaccinale adeguata alla realtà avicola di una determinata filiera avicola e/o di un territorio. La caratterizzazione sierologica di RA ha subito continue rimodulazioni e attualmente consta di 24 sierotipi i quali sono identificati mediante l'utilizzo di sieri iperimmuni di coniglio (Bisgaard, 1982). La determinazione del sierotipo talvolta può essere inconclusiva per ceppi non caratterizzabili o cross-reazioni tra sieri, inoltre la

produzione di questi sieri è un processo che prevede tempi lunghi, costi non indifferenti e, non per ultimo, la questione etica dell'utilizzo di animali per la sperimentazione animale/produzione di test diagnostici (D. Lgs. 4 marzo 2014, n. 26).

La metodologia della Spettroscopia ad infrarosso alla trasformata di Fourier (FT-IR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) è una innovativa tecnica fenotipica per la caratterizzazione di ceppi batterici. Tale metodica analizza le differenti componenti molecolari che costituiscono il corpo batterico. Nello specifico, i legami chimici dei gruppi funzionali caratterizzanti le diverse molecole biologiche (lipidi, proteine, zuccheri, acidi nucleici) vibrano in determinate modi quando colpite dalla radiazione infrarossa (IR). L'acquisizione delle vibrazioni complessive di un sistema complesso quali i sistemi biologici, le quali riflettono la complessità dei differenti componenti chimici, dà origine ad uno spettro caratteristico che permette di differenziare i batteri in funzione delle loro componenti di superficie (sierotipo/capsulotipo) (Novais et al., 2019).

Questo contributo vuole valutare le capacità di IR Biotyper® (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) di discriminare i diversi ceppi di RA in funzione del sierotipo.

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione ed identificazione dei ceppi di Riemerella anatipestifer*

Sono stati selezionati 24 ceppi di RA collezionati durante la Ricerca Corrente IZSVe 14/16 e conservati presso la collezione IZSVe Sezione di Treviso e i 19 ceppi di RA di referenza sierotipo-specifici gentilmente concessi dal professor Christensen H. dell'Università di Copenaghen che qui si ringrazia.

I ceppi di campo selezionati sono i seguenti: 15 ceppi RA sierotipo 1 isolati da tacchino (n. 5), da pollo da carne (n. 8) e da anatra (n. 2); 2 ceppi sierotipo 6 isolati da oca e anatra, 1 ceppo sierotipo 13 isolato da pollo e 6 ceppi sierotipo 18 isolati da tacchino (n. 3), faraona da carne (n. 1) e anatra (n. 2).

I ceppi di campo sono stati precedentemente identificati mediante prove biochimiche e confermati mediante analisi MALDI TOF MS utilizzando lo strumento Sirius Biotyper® (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). I ceppi sottoposti ad analisi FT-IR sono stati preventivamente sierotipizzati con antisieri policlonali di coniglio prodotti all'interno della Ricerca Corrente IZSVe 14/16 impiegando ceppi di referenza per ciascun sierotipo (1-3, 5-19, 21).

### *Preparazione ed analisi dei ceppi di RA*

I ceppi sono stati coltivati su terreno agar sangue di montone per 24 ore, a 37 °C, in condizioni di microaerofilia. Un'ansata di crescita batterica è stemperata con 50 µl acqua ultrapura per biologia molecolare in apposite provette contenenti dei cilindri metallici inerti (Bruker IR Biotyper Kit) e successivamente vengono aggiunti 50 µl di etanolo 70%. La soluzione viene vortexata fino ad ottenere una soluzione omogenea. Ogni ceppo viene analizzato in 4 repliche al fine di poter evidenziare la varianza biologica, 15 µl di sospensione batterica precedentemente preparata viene deposta su ogni pozzetto dell'apposita piastra in silicio. Successivamente la piastra viene messa a 37 °C per 30 minuti per fare evaporare l'acqua presente. L'acquisizione degli spettri è stata effettuata con lo spettrometro IRBT e il software OPUS (Bruker Optics GmbH & Co. KG). Ogni spettro IRBT viene acquisito nel range 3999-500 cm<sup>-1</sup>, e l'assorbimento della radiazione IR viene misurato per ogni numero intero di lunghezza d'onda (quindi

ogni spettro sarà rappresentato da 3500 *datapoints*). Ogni corsa prevede la lettura del bianco lasciando vuoto un pozzetto e la lettura di 2 appositi calibranti (IRTS 1, IRTS 2) che vengono preparati e letti in doppio.

L'analisi degli spettri è stata effettuata con software IR Biotyper Client V4.0 (Bruker Daltonics). La prima fase di analisi degli spettri, definita analisi esplorativa è propedeutica alla creazione di classificatori automatici mediante il *training* di algoritmi di *machine learning*, consiste nel valutare le differenze fenotipiche attraverso l'analisi degli spettri. Lo spettro contiene moltissime informazioni (3500 *datapoints*/spettro) ma non tutte sono utili per discriminare i ceppi. Alcune regioni dello spettro sono altamente discriminanti, in funzione dei gruppi funzionali che assorbono in quella determinata regione (es. 1200-900  $\text{cm}^{-1}$  carboidrati, 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  gruppi C-H delle catene lipidiche, 1500-1400  $\text{cm}^{-1}$  gruppi funzionali -COOH, etc.). Applicando il metodo di *splicing* (di default la regione spettrale utilizzata è 1300-800  $\text{cm}^{-1}$ , ma può essere diversa a seconda di quello che si vuole discriminare), si «taglia» lo spettro nella regione di interesse (quindi i *datapoints* da 3500 diventano 501, nel caso dello *splicing method* di default). All'interno di queste regioni ristrette non tutti i *datapoints* portano un'informazione importante per la discriminazione. L'applicazione di strumenti statistici quali analisi delle componenti principali (PCA, *Principal Component Analysis*) ed analisi delle discriminanti lineari (LDA, *Linear Discriminant Analysis*) permette la riduzione dimensionale degli spettri in maniera tale da escludere i dati che non portano un'informazione significativa (varianza tecnica, rumore di fondo, varianza biologica) e «ridurre» lo spettro ad una dimensione tale da comprendere la varianza di interesse ai fini della discriminazione cui si è interessati. Il numero di componenti principali (PC) e discriminanti lineari (LD) varia in funzione della specie e del target di differenziazione ed in genere è sui 20-30 *datapoints*.

Le informazioni elaborate dal software IRBT possono essere visualizzate graficamente per rilevare visivamente le differenze. L'analisi in PCA o LDA viene elaborata graficamente con dei scatterplots distribuite su 3 dimensioni (asse x PC1/LD1, asse y PC2/LD2 e asse z PC3/LD3) in cui sono rappresentati i 3 principali componenti di varianza (Fig. 1). Tuttavia le dimensioni possono essere modificati al fine di ottenere la visualizzazione migliore. In molti casi le caratteristiche discriminanti vengono portate da PC e/o LD successive, ne consegue che per valutare la capacità discriminativa del metodo si devono valutare tutte le dimensioni simultaneamente attraverso il *deviation plot* che visualizza lo spettro medio e la varianza sotto forma di alone oppure il *parallel plot* che visualizza ogni singolo spettro (Fig. 2). Se una classe di interesse può essere differenziata anche in una sola dimensione, questa è sufficiente per il software IRBT.

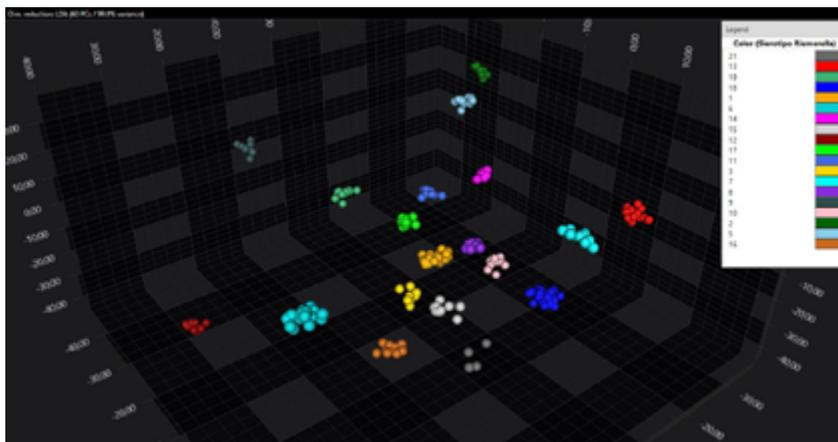
L'analisi esplorativa permette la definizione dei campioni che andranno a formare il *training set* del classificatore, che dovrebbe essere selezionato in modo tale da rappresentare la varianza presente in ciascuna classe. L'applicazione degli algoritmi di machine learning, compresi nel software IR Biotyper (*artificial neural network*; ANN e *support vector machine*, SVM) consentono la creazione di classificatori automatici, aventi come target il livello intra-specie di interesse (sierogruppo, sierotipo, sequence type, etc.), che permettono di utilizzare lo strumento per la tipizzazione di routine.

La seconda fase di analisi, definita "*testing and validation*" permette di verificare se i classificatori creati discriminano correttamente i ceppi in funzione del carattere di interesse utilizzando ceppi batterici già caratterizzati ma "incogniti" per il classificatore, dei quali non viene riportata l'informazione di interesse al classificatore.

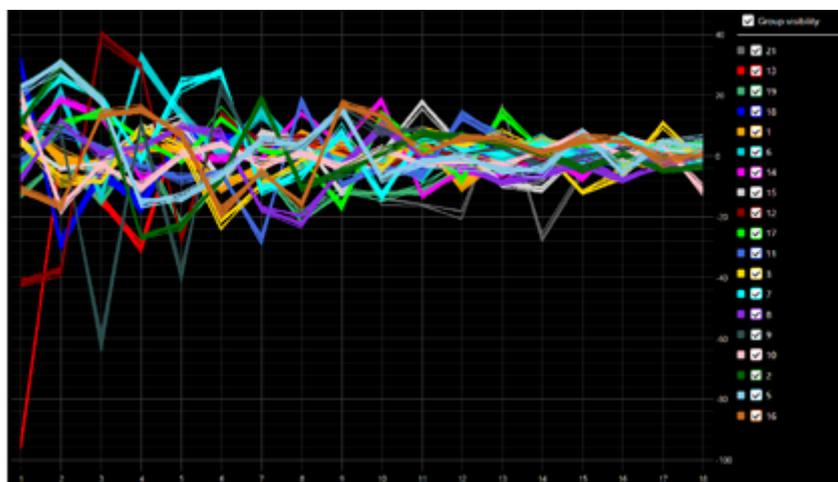
## RISULTATI

I risultati in fase di analisi esplorativa e “training” mostrano una chiara clusterizzazione dei ceppi di campo di RA con i ceppi sierotipo specifici appartenenti allo stesso sierotipo (Fig. 1). L’elaborazione grafica degli spettri in modalità “*deviation plot*” dimostra che tutti i ceppi del sierotipo 1 possiedono lo stesso profilo il quale si differenzia visivamente dagli altri sierotipi, in particolare dai sierotipi 3, 6, 13 e 18 che rappresentano i sierotipi circolanti riscontrati in Italia (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6) (Bano et al., 2020).

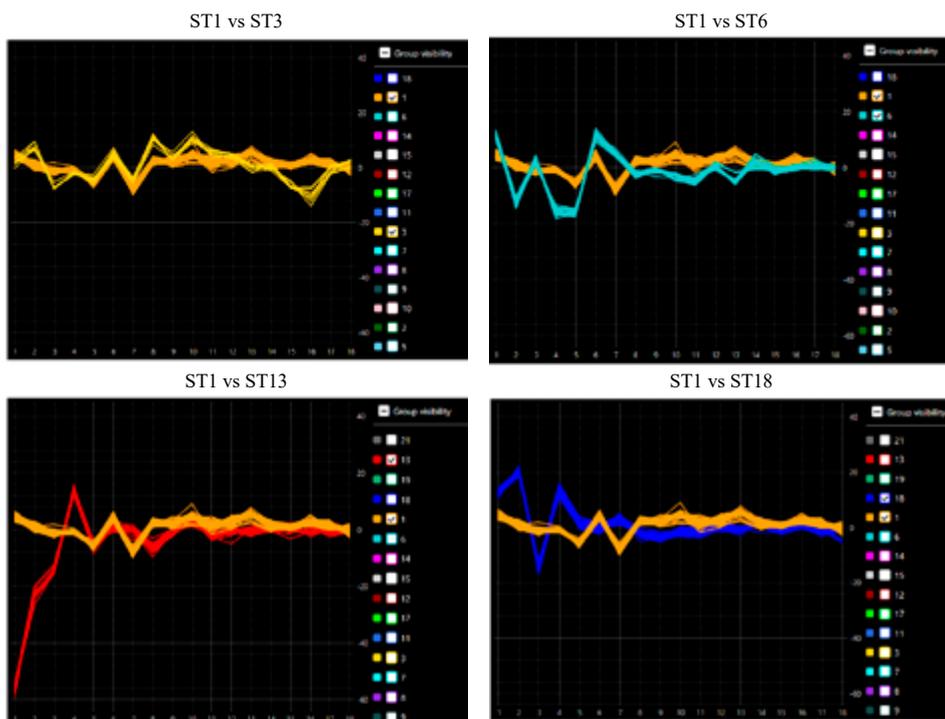
Inoltre, i ceppi appartenenti ai sierotipi 3, 6, 13 e 18 presentano un profilo di spettri differente tra loro.



**Figura 1.** Scatterplots dei ceppi di RA analizzati in LDA con i seguenti parametri: *Default splicing method*; LDA60;  $x=LD4$ ,  $y=LD2$ ,  $z=LD5$ . I differenti colori rappresentano i diversi sierotipi come indicato in legenda.



**Figura 2.** Visualizzazione degli spettri in *deviation plot*. I differenti colori rappresentano i differenti sierotipi come indicato in legenda.



**Figure 3, 4, 5, 6.** L'elaborazione grafica in *deviation plot* mostra le differenze di spettro tra il sierotipo 1 e i sierotipi 3, 13 e 18.

## DISCUSSIONE

L'obiettivo dello studio era verificare le capacità discriminative di FT-IR per la sierotipizzazione dei ceppi di RA. Tale informazione risulta di estrema rilevanza ai fini della scelta del vaccino da impiegare in strategie immunoprofilattiche. Ad oggi, sono stati individuati 21 sierotipi e tale classificazione ha subito diverse rimaneggiamenti nel tempo (Ruiz e Sandhu, 2020). Attualmente la classificazione si basa sullo schema proposto da Bisgaard (1982) definita attraverso tecniche di sieroagglutinazione utilizzando sieri policlonali di coniglio precedentemente immunizzati con le componenti lipopolisaccaridiche sierotipo-specifiche. Questa metodica, sebbene sia riconosciuta come *gold standard* per la sierotipizzazione di RA, richiede tempi lunghi per la produzione, costi elevati e pone questioni etiche legate all'impiego di animali nelle sperimentazioni scientifiche. Inoltre, tale metodo non produce sempre risultati conclusivi per alcuni ceppi che non reagiscono a nessun antisiero o per cross-reazioni tra 2 o più antisieri. La disponibilità di metodi rapidi ed economici di sierotipizzazione permette di ottenere informazioni preziose per la gestione della malattia. In questo contesto la metodica FT-IR rappresenta un promettente ed innovativo metodo fenotipico per la sierotipizzazione basato sulla caratterizzazione di differenti componenti molecolari della cellula batterica. Inoltre, tale metodica permette di superare le problematiche etiche di sperimentazione animale per la produzione di sieri.

Le analisi preliminari eseguite con la metodica FT-IR sui ceppi di referenza evidenziano che è possibile discriminare gli spettri in funzione del sierotipo. Inoltre, l'elevata clusterizzazione tra gli spettri acquisiti dai ceppi di campo di RA in funzione del sierotipo espresso lascia ipotizzare un suo impiego per la sierotipizzazione routinaria degli isolati diagnostici (Fig. 1). Essendo una metodica di recente introduzione, il software IRBT, che analizza ed elabora gli spettri, necessita di numerosi isolati con caratterizzazione nota (es: sierotipo, biotipo, capsulotipo, etc) per poter determinare quali sono le informazioni discriminanti da quelle “non utili per la discriminazione”. A tal proposito, per poter creare maggiore variabilità per quei sierotipi di cui si possiedono pochi ceppi di campo o nessun ceppo di campo, si è proceduto ad allestire repliche degli stessi ceppi di referenza variando alcuni parametri tecnici quali l'operatore che prepara il campione e i tempi di incubazione dei ceppi (24 vs 48 ore). In questo modo l'acquisizione di spettri differenti va a “stressare” lo strumento in maniera tale che gli algoritmi statistici riescano a identificare con maggiore precisione e specificità i *datapoints* utili per creare dei classificatori automatici solidi nel discriminare i ceppi per il carattere di interesse.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano che la metodica FT-IR potrebbe essere applicata di routine per la sierotipizzazione di RA potendo essere un metodo alternativo valido rispetto alla sieroagglutinazione attualmente impiegata. Tale metodo riesce a superare le problematiche di natura etica che comporta la produzione di antisieri policlonali di coniglio. Al fine di rendere più robusto il sistema di classificazione dei ceppi è necessario sottoporre ad analisi FT-IR ulteriori ceppi di campo di RA appartenenti a sierotipi poco frequenti o non presenti in Italia in maniera tale da “stressare” l'algoritmo di classificazione e se necessario effettuare un nuovo training, al fine di ottimizzarlo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sandhu TS. (2008). In: *Diseases of Poultry (12<sup>th</sup> edition)*, Blackwell Publishing, pp. 758–764.
2. 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, and I Drigo. (2020). Caratterizzazioni genotipiche e fenotipiche di ceppi di *Riemerella anatipestifer* isolati da pollame in Italia. In: *Atti del V simposio scientifico della Società Italiana di Patologia Aviaria*, pp. 45-51.
3. Bisgaard M. (1982). Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer* species incertae sedis, using slide and tube agglutination. *Avian pathology* 11: 341-350.
4. DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. (14G00036) (GU Serie Generale n.61 del 14-03-2014).
5. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, and L Peixe. (2019). Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38: 427-448.
6. Ruiz JA and TS Sandhu. (2020). *Riemerella anatipestifer* infection. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (Eds.), *Diseases of Poultry (14<sup>th</sup> edition)*, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, pp. 257–283.

# RIPRODUZIONE SPERIMENTALE DELL'ENTERITE NECROTICA DEL TACCHINO IMPIEGANDO DIVERSI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Cordioli B.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Palazzolo L.<sup>1</sup>, Garbuio M.<sup>1</sup>, Zandonà L.<sup>1</sup>, Zanardello C.<sup>2</sup>, Gagliazzo L.<sup>2</sup>, Guolo A.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>1</sup>, Vereecken M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba (TV), Italia

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italia

<sup>3</sup>Huvepharma NV

## Summary

Necrotic enteritis (NE) is a disease affecting both chickens and turkeys. The aim of the present study was to investigate whether two *Clostridium perfringens* (Cp) field strains with differences in the genetic virulence factors and species of isolation (chicken and turkey) were able to reproduce the clinical form of the disease in a turkey model.

The study involved 4 groups of turkeys: a negative control (T01) and three experimental groups, which were fed with a predisposing diet and were challenged with *Eimeria meleagridis* (group T02, T03 and T04) and Cp inocula (groups T03 and T04). Lesions indicative of necrotic enteritis were evaluated from a clinical, macroscopic and histopathological point of view.

The protocol was successful not only in the reproduction of the severe macroscopic and histological intestinal lesions, but also affecting the health status of the birds of group T03 with a mortality rate that reached 80%. The association between the experimental diet and coccidia infection was not able to reproduce macroscopic lesions as severe as the same predisposing factors associated with Cp inoculum ( $p < 0.0001$ ), regardless of the origin and virulence factors of the Cp strain.

Histologically, only the *netB+tpcL*+Cp strain (T03) led to significantly more severe lesions in the jejunum. Such toxins are described only in few of the strains isolated in EN outbreaks; therefore, their role in the pathogenesis of the disease in turkeys should be further investigated.

The availability of a robust protocol for the reproduction of the disease could allow the study of predisposing factors and the *in vivo* evaluation of the efficacy of products alternative to antimicrobial for the control of NE in turkeys.

## INTRODUZIONE

L'enterite necrotica (EN) è una patologia multifattoriale che colpisce pollo e tacchino, provocata dall'azione di tossine prodotte da *Clostridium perfringens* (Cp), bacillo Gram positivo, sporigeno, anaerobio facoltativo (Wade et al., 2015; Prescott et al., 2016).

I ceppi di Cp vengono storicamente classificati in 5 tossinotipi (A-E) sulla base della produzione di 4 tossine principali (*alpha*, *beta*, *epsilon* e *iota*) (Petit et al., 1999). Successivamente Rood et al. (2018) hanno suggerito di includere in tale

classificazione anche l'enterotossina (CPE) e la tossina necrotic enteritis B-like (NetB), identificando rispettivamente i tossinotipi F e G.

Tra le tossine maggiormente studiate nei casi di EN si ritrovano la tossina TpeL, prevalentemente correlata a ceppi di tossinotipo A coinvolti in episodi di EN nel pollo, e la tossina NetB, che agisce formando eptameri che si inseriscono nella membrana citoplasmatica portando a necrosi delle cellule epiteliali intestinali (Chalmers et al., 2008; Keyburn et al., 2010, Savva et al., 2013; Yan et al., 2013). In numerosi studi ceppi di Cp dotati del gene *netB* sono stati utilizzati per la riproduzione sperimentale della malattia nel pollo, sebbene siano segnalati casi clinici di EN sostenuti da isolati privi di tale gene (Keyburn et al. 2008; Llanco et al., 2012; Li et al., 2017; Prescott et al., 2016; Timbermont et al., 2011).

L'enterite necrotica è ampiamente descritta nel tacchino, ma vi è scarsa letteratura scientifica riguardo patogenesi e protocolli sperimentali di induzione della malattia in questa specie. Studi di tossinotipizzazione di ceppi di Cp isolati in casi di EN in Italia, USA e Finlandia hanno evidenziato una prevalenza del 97-100% del tossinotipo A (Lyhs et al., 2013; Giovanardi et al., 2013; Smyth 2022). L'EN del tacchino si presenta con maggior frequenza nei soggetti maschi di età compresa tra le 6 e le 11 settimane e studi retrospettivi hanno permesso di individuare tra i principali fattori predisponenti la concomitanza di patologie intestinali, in particolare infezione da virus dell'enterite emorragica, con conseguente immunodepressione, e coccidiosi (sostenuta da *Eimeria* spp) (Droual et al., 1995). Quest'ultima, determinando danno epiteliale, consente la proliferazione di Cp e successiva produzione di tossina (Droual et al., 1994). Inoltre, Kaldhusdal et al. (2021) hanno evidenziato una correlazione statistica tra casi di EN nel tacchino e stagionalità, con maggiore incidenza nel periodo tra Marzo e Aprile, e azienda, ipotizzando una possibile influenza di management, biosicurezza e stabulazione degli animali nella patogenesi della malattia.

L'induzione sperimentale dell'EN è fondamentale per approfondire lo studio della patogenesi della malattia e, mentre nel broiler l'EN è stata ampiamente studiata e approfondita, in letteratura è disponibile solo un articolo che considera possibili fattori predisponenti nel tacchino (Hardy et al., 2020). Lo scopo dello studio era investigare la capacità di riprodurre sperimentalmente l'EN impiegando ceppi di Cp isolati da episodi di malattia in specie diverse (pollo e tacchino) e dotati di diversi fattori genetici di virulenza.

## **MATERIALI E METODI**

### *Disegno sperimentale*

L'utilizzo di animali a scopi scientifici è stato autorizzato dal comitato etico IZSVE (CE IZSVE 7/2021) e dal Ministero della Salute (autorizzazione n.4/2023-PR). Centoquattro tacchini maschi B.U.T. di 1 giorno sono stati stabulati in box dello stabulario IZSVE con densità massima di 10kg pv/m<sup>2</sup> e libero accesso a cibo e acqua. Gli animali sono stati identificati individualmente e suddivisi in 4 gruppi. I soggetti del gruppo T01 (25, gruppo controllo) sono stati alimentati con un programma alimentare costituito da mangime commerciale starter per le prime 4 settimane (fino al giorno D27) e mangime grower fino al termine della sperimentazione (D42). Invece, i soggetti dei gruppi T02, T03 e T04 (26 per gruppo, gruppi sperimentali) sono stati alimentati con una dieta predisponente. Tale piano

alimentare prevedeva per i primi 16 giorni un mangime starter a base di frumento e riso addizionato di soia come fonte proteica, la quale, è stata sostituita da fish-meal (30%) dal D17 fino alla fine della sperimentazione.

Il giorno D34 i soggetti dei gruppi T02, T03 e T04 sono stati infettati tramite gavage con 15.000-20.000 oocisti/tacchino di *Eimeria meleagridis*. Nei D38, D39 e D40, invece i soggetti dei gruppi T03 e T04 sono stati infettati tramite gavage con due differenti colture di Cp alla concentrazione di  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml (3ml/tacchino). Le caratteristiche dei ceppi somministrati ai soggetti dei gruppi T03 e T04 sono riassunte in tabella 1 e in tabella 2 è riportato il calendario della sperimentazione.

Gruppo	Origine	Tossinotipo	NetB	TpeL	CPE	Beta-2
T03	Broiler	A	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
T04	Tacchino	A	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

**Tabella 1.** Caratteristiche degli isolati di Cp utilizzati nella sperimentazione.

Giorno	Evento
D1	Assegnazione dei tacchini ai 4 gruppi sperimentali
D16	Cambio dieta per i soggetti dei gruppi T02, T03 e T04
D34 e D35	Inoculo con <i>E. meleagridis</i> (15.000-20.000 oocisti/tacchino) per i gruppi T02, T03 e T04
D38, D39 e D40	Inoculo <i>Clostridium perfringens</i> nei gruppi T03 (Cp broiler) e T04 (Cp tacchino)
D42	Soppressione degli animali, score delle lesioni macroscopiche e raccolta campioni istopatologia

**Tabella 2.** Calendario degli eventi della sperimentazione.

Lo stato di salute degli animali è stato monitorato quotidianamente ed i soggetti morti o sacrificati per ragioni di benessere animale sono stati conservati refrigerati fino all'esecuzione dell'esame anatomopatologico (entro 48 ore).

#### *Score macroscopico delle lesioni*

I soggetti morti successivamente all'induzione della malattia ed i soggetti soppressi il D42 sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico con valutazione dello score delle lesioni macroscopiche secondo i parametri descritti da Hardy et al. (2020). Tale score prevede 4 punteggi variabili da "0", in cui l'intestino ha colorazione, aspetto e contenuto fisiologico, a "3", in cui la mucosa intestinale appare edematosa e/o con ulcere, avvallamenti e pseudomembrane che ne coprono la superficie.

### *Istologia*

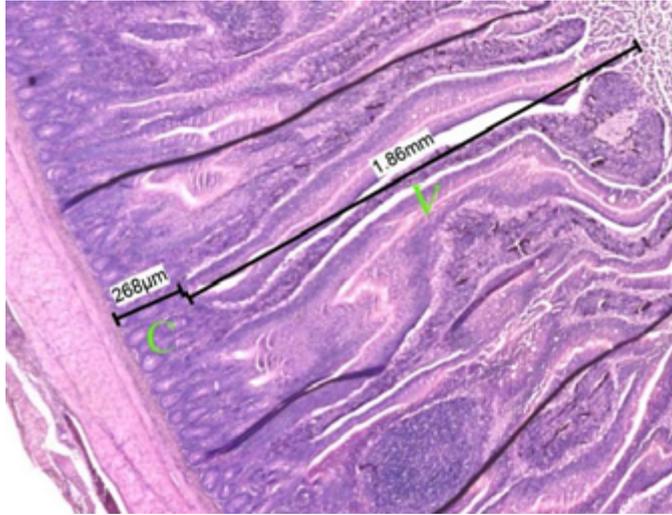
Da un campione statisticamente significativo di 13 soggetti per gruppo sono state prelevate sezioni di duodeno, digiuno (in prossimità del diverticolo di Meckel) e ileo in prossimità della giunzione ileo-ciecale. I campioni sono stati immediatamente immersi in formalina tamponata al 10%, lasciati a fissare per 48h e successivamente inviati al laboratorio di istopatologia dell'IZSVe. Ogni sezione intestinale è stata valutata istologicamente considerando 7 parametri per ciascuno dei quali è stato sviluppato e attribuito un punteggio da 1 a 4 basandosi sulle lesioni presenti e su quanto riportato in letteratura (Tabella 3) (Gholamiandehkordi et al., 2007; Hoerr e Schrader, 2016). Al fine di effettuare una più agevole comparazione tra i punteggi attribuiti alle lesioni macroscopiche e istologiche si è deciso di applicare uno score globale (da 1 a 4) a ciascun segmento intestinale analizzato istologicamente. Per ottenere questo score i punteggi attribuiti ai 7 parametri di valutazione sono stati suddivisi in 4 diverse fasce in modo che al punteggio "1" corrispondesse un punteggio pari a 7, al "2" un punteggio compreso tra 8 e 14, al "3" un punteggio compreso tra 15 e 21 e al "4" tra 22 e 28. In tutti i soggetti è stata eseguita la valutazione morfometrica dei villi intestinali nelle sezioni trasversali di duodeno utilizzando lo strumento Aperio LV1 (Live View Pathology Digital System - Leica Biosystems). In campi selezionati in modo randomizzato sono state misurate, per ciascuna sezione di duodeno, la lunghezza di 5 villi (V) e la profondità delle cripte corrispondenti (C) come esemplificato in Figura 1. Si è provveduto poi a determinare il rapporto lunghezza villo/profondità della cripta (V/C ratio).

### *Analisi statistica*

Il test del chi-quadro è stato utilizzato per evidenziare differenze significative nella mortalità tra gruppi, mentre differenze statisticamente significative tra gli score macroscopici e microscopici tra i gruppi T02-T03 e T02-T04 sono state calcolate con test di Mann-Whitney. L'effetto del gruppo sulla distribuzione dei parametri istologici è stato determinato con un modello generale lineare.

	Parametro istologico	Score	Descrizione
1	Fusione dei villi	1	Occasionale fusione di 2 villi
		2	Occasionale fusione di >2 villi o molteplici fusioni
		3	Aree multiple di fusione di >2 villi
		4	Diffuse ed estesi cluster di fusione dei villi
2	Atrofia dei villi	1	Nei limiti (focale atrofia di singoli villi)
		2	Lieve (multifocale atrofia di singoli villi)
		3	Moderata (circa 50% dei villi atrofici)
		4	Da marcata a grave (> 50% dei villi atrofici)
3	Iperplasia delle cripte	1	Nei limiti (focale iperplasia delle cripte)
		2	Lieve (multifocali iperplasia delle cripte)
		3	Moderata (circa 50% di iperplasia delle cripte)
		4	Da marcata a grave (>50% di iperplasia delle cripte)
4	Emorragie capillari	1	Alcuni globuli rossi extra-capillari in alcuni villi
		2	Alcuni globuli rossi extra-capillari nella maggior parte dei villi
		3	Molti globuli rossi extra-capillari in parti della sezione
		4	Gravi emorragie
5	Mancanza di cellule epiteliali	1	Appiattimento delle cellule epiteliali sulla cima dei villi
		2	Mancanza o micro-erosioni sulla cima di alcuni villi
		3	Mancanza o micro-erosioni sulla cima di numerosi villi
		4	Gravi erosioni, estesa mancanza di cellule epiteliali
6	Materiale proteinaceo nel lume intestinale	1	Alcuni spot di materiale proteinaceo
		2	Molteplici spot di materiale proteinaceo
		3	Grandi aggregate di material proteinaceo
		4	Lume pieno di materiale proteinaceo
7	Infiltrazione infiammatoria nella lamina propria	1	Minima (focale infiltrazione leucocitaria)
		2	Lieve (multifocale e lieve infiltrazione leucocitaria)
		3	Moderata (multifocale e moderata infiltrazione leucocitaria o diffusa e lieve infiltrazione leucocitaria)
		4	Grave (diffusa e moderata/grave infiltrazione leucocitaria)

**Tabella 3.** Parametri istologici considerati e punteggio delle lesioni istologiche.



**Figura 1.** Determinazione della lunghezza del villo (V) e della profondità della cripta (C).

## RISULTATI

### *Mortalità*

Ad eccezione di un soggetto del gruppo T01 soppresso il giorno 18 e sottoposto ad esame anatomopatologico, nessun soggetto è deceduto nei primi 40 giorni di sperimentazione. L'esame anatomopatologico del soggetto soppresso ha evidenziato grave disidratazione.

Successivamente al challenge con coccidi e Cp, solo nel gruppo T03 si è registrata mortalità nei giorni D41 e D42 (rispettivamente 7 e 14 soggetti), come schematizzato in tabella 4.

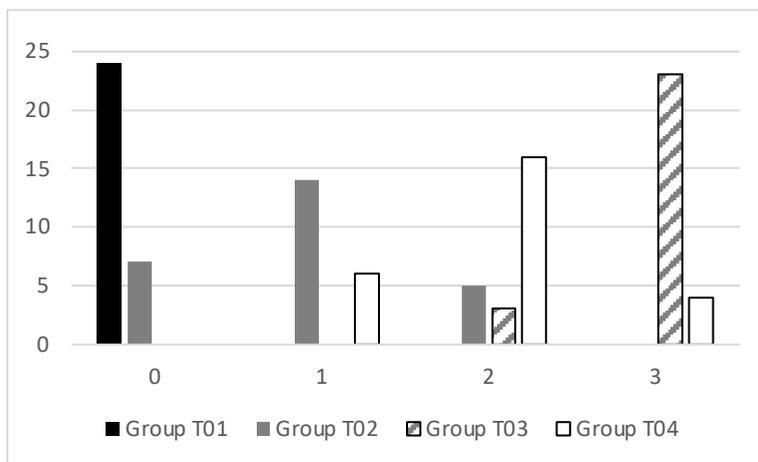
GRUPPO	1 (T01)	2 (T02)	3 (T03)	4 (T04)
Consistenza del gruppo	24	26	26	26
Soggetti morti (D40+D41)	0	0	21 (7+14)	0
%Mortalità	0.0%	0.0%	80.8%	0.0%

**Tabella 4.** Mortalità suddivisa nei gruppi sperimentali.

### *Score macroscopico delle lesioni*

Tutti i soggetti appartenenti al gruppo T01 non avevano lesioni macroscopicamente evidenti (score "0"), mentre nel gruppo T02, nonostante 5 animali abbiano ottenuto il punteggio "2", la maggior parte dei soggetti ha evidenziato lesioni di grado lieve (7 animali con punteggio "0" e 14 con punteggio "1"). Nel gruppo T03 si sono registrate le lesioni più gravi: 3 soggetti (11.5%) con punteggio "2", mentre l'88.5% dei tacchini aveva lesioni di grado "3". La maggior parte dei soggetti (61.5%) del gruppo T04 aveva lesioni di grado "2", mentre il 23.1% (6 tacchini) e il 15.4% (4

animali) hanno ottenuto rispettivamente il punteggio “1” e “3”. La distribuzione dei punteggi macroscopici nei diversi gruppi sperimentali è rappresentata nella Figura 2 e schematizzata in Tabella 5.



**Figura 2.** Distribuzione degli score macroscopici. L’asse delle ascisse rappresenta lo score (0-3), mentre l’asse delle ordinate rappresenta il numero di soggetti per gruppo.

Score	0	1	2	3
Gruppo T01	24 (100)			
Gruppo T02	7 (26.9)	14 (53.9)	5 (19.2)	0
Gruppo T03	0	0	3 (11.5)	23 (88.5)
Gruppo T04	0	6 (23.1)	16 (61.5)	4 (15.4)

**Tabella 5.** Numero di tacchini (%) per gruppo assegnati a ciascun punteggio.

L’analisi statistica ha evidenziato che il challenge con Cp-broiler associato a infezione coccidica e dieta sperimentale nel gruppo T03 ha portato a lesioni macroscopiche statisticamente più gravi della sola associazione tra dieta sperimentale e coccidi ( $p < 0.0001$ ). Tale significatività statistica è stata confermata anche paragonando i gruppi T02 e T04 ( $p < 0.0001$ ).

### Istologia

I preparati istologici di due soggetti del gruppo T02 e di un soggetto del gruppo T03 non sono stati considerati idonei alle valutazioni istopatologiche a causa della permanenza di alimento nel lume del tratto intestinale prelevato a tale scopo.

Nel gruppo T01 gli animali avevano minime alterazioni istopatologiche soprattutto a carico di duodeno e digiuno nei quali, rispettivamente in 8/12 animali e 7/13, è stato attribuito lo score 1. Gli animali ai quali è stato attribuito uno score 2 presentavano,

rispetto a quelli con score 1, un punto in più nei parametri 4 (emorragie capillari) o 7 (infiltrazione infiammatoria della lamina propria). A tutti gli animali (13/13) è stato attribuito un punteggio 2 a livello di ileo e presentavano punteggi variabili da 2 a 3 per i parametri 1 (fusione dei villi), 2 (atrofia dei villi) e 7. Nel gruppo T02 lo score 2 è stato attribuito alla maggior parte degli animali per tutti i tratti intestinali esaminati (10/11 duodeno, 11/11 digiuno, 10/11 ileo). Questi animali avevano punteggi variabili da 2 a 3 per i parametri 1, 2 e 7. Nel gruppo T03 buona parte dei soggetti ha ottenuto lo score 3 su almeno uno dei tratti intestinali esaminati. A 9/12 tacchini è stato attribuito lo score 4 in sede digiunale. Per tutti e tre i tratti intestinali i parametri valutati con score maggiore (score 3 e 4) sono stati 1, 2, 5 (mancanza di cellule epiteliali), 6 (materiale proteinaceo nel lume intestinale) e 7. Nel gruppo T04 alla maggior parte dei tacchini è stato attribuito score 2 in tutti e 3 i tratti intestinali. Il dettaglio e la suddivisione dei punteggi per gruppo sperimentale e tratto intestinale è riportato in Tabella 6.

Gruppo	Punteggio				
		1	2	3	4
Gruppo T01	Duodeno*	8 (67)	4 (33)	/	/
	Digiuno	7 (54)	6 (46)	/	/
	Ileo	/	13 (100)		
Gruppo T02	Duodeno	1(9.1)	10 (90.9)	/	/
	Digiuno	/	11 (100)	/	/
	Ileo	/	10 (90.9)	1 (9.1)	/
Gruppo T03	Duodeno	/	3 (25)	6 (50)	3 (25)
	Digiuno	/	2 (16,7)	1 (8,3)	9 (75)
	Ileo	/	4 (33,3)	6 (50)	2 (16,7)
Gruppo T04	Duodeno	3 (23,1)	10 (76,9)	/	/
	Digiuno*	/	12 (100)	/	/
	Ileo	1 (7,7)	12(92,3)	/	/

**Tabella 6.** Distribuzione dei punteggi istologici all'interno dei gruppi sperimentali. Note: \*=un campione è risultato inadatto (autolisi) e di conseguenza non è stato sottoposto ad analisi.

La comparazione tra i gruppi ha evidenziato significatività statistica a livello digiunale tra i gruppi T02 e T03 mentre non è emersa nessuna significatività tra i gruppi T02 e T04. I risultati delle comparazioni tra i gruppi per i vari segmenti intestinali sono riassunti in Tabella 7.

Gruppi	Mann Whitney test, p-value		
	Duodenum	Jejunum	Ileum
2 vs 3	0.0002692	<0.0001	0.0079
2 vs 4	0.60	-	0.52

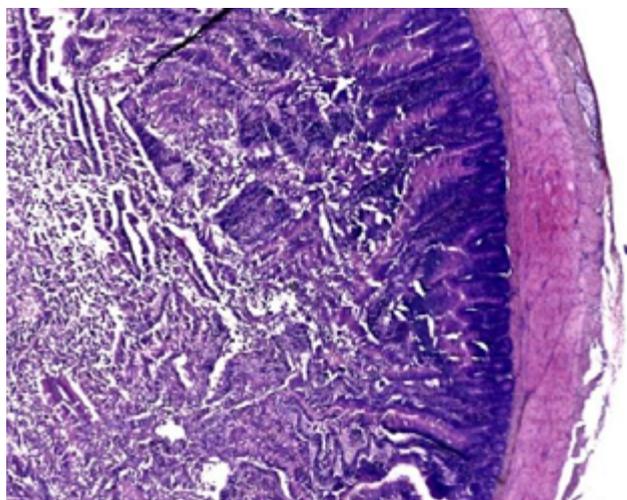
**Tabella 7.** Analisi statistica degli score istologici dei differenti tratti intestinali.

La valutazione di V e C e, di conseguenza, della V/C ratio non è stata sempre possibile in quanto molte sezioni di duodeno, indipendentemente dal gruppo di appartenenza, presentavano artefatti di conservazione/fenomeni autolitici (Figura 3) tali da non rendere attuabile/veritiera la valutazione morfometrica dei villi.

Nel gruppo T01 è stato possibile effettuare 30 delle 65 misurazioni previste (13 animali per 5 misurazioni), nel gruppo T02 43/55 (78,2%), in T03 32/ 60 (53,3%) e per il gruppo T04 30/65 (46,2%). In tabella 8 sono riportate le misurazioni disponibili in ogni gruppo sperimentale. Considerato l'esiguo numero di misurazioni ottenute per gruppo sperimentale, si è deciso di non proseguire con l'analisi dell'effetto di appartenenza al gruppo sulla distribuzione dei parametri istologici (V, C e V/C ratio) in quanto il dato ottenuto non è stato ritenuto rappresentativo.

	N animali	N misurazioni disponibili (%)
GRUPPO 1 (T01)	13	30 (46.1)
GRUPPO 2 (T02)	11	43 (78.2)
GRUPPO 3 (T03)	12	32 (53.3)
GRUPPO 4 (T04)	13	30 (46.2)

**Tabella 8.** Misurazioni disponibili (%) per gruppo sperimentale.



**Figura 3.** Duodeno, gruppo T01. Stato di conservazione dell'organo.

## DISCUSSIONE

Lo scopo dello studio era investigare la capacità di riprodurre sperimentalmente l'enterite necrotica impiegando ceppi di Cp isolati da episodi di malattia in specie diverse (pollo e tacchino) e dotati di diversi fattori genetici di virulenza.

Il primo obiettivo dello studio era la messa a punto di un protocollo sperimentale efficace nel riprodurre l'EN in questa specie ed è stato ampiamente raggiunto nel gruppo T03, in cui si sono riprodotte non solo le caratteristiche lesioni macro e microscopiche, ma anche gli aspetti più gravi della forma clinica dell'EN raggiungendo l'80% di mortalità.

La sperimentazione ha evidenziato che la sola associazione tra dieta sperimentale e infestazione coccidica non è in grado di produrre lesioni macroscopiche paragonabili agli stessi fattori predisponenti associati alla presenza di Cp. Infatti, nei gruppi T03 e T04 le lesioni macroscopiche sono significativamente più gravi rispetto al gruppo T02 ( $p < 0.0001$ ). Tale significatività statistica è stata confermata nel grading istologico solo a livello digiunale nel gruppo T03, mentre non si sono evidenziate alterazioni microscopiche statisticamente significative tra i gruppi T02 e T04. Ciò potrebbe essere dovuto al tratto intestinale inviato per le analisi istologiche, il quale è limitato rispetto all'osservazione dell'intero pacchetto intestinale eseguita in sede anatomopatologica. Invece, la mancata rappresentatività dei dati di lunghezza e profondità di villi e cripte per lo scarso numero di misurazioni è imputabile al mancato digiuno degli animali le 24h precedenti la soppressione (la dieta rappresentava uno dei principali fattori predisponenti) e al ridotto lavaggio in fisiologica del campione da destinare all'istologia. Tali fattori potrebbero aver influito negativamente sulla conservazione delle caratteristiche morfometriche dei villi.

I risultati clinici, macroscopici e microscopici lasciano ipotizzare un coinvolgimento delle tossine NetB e TpeL nella patogenesi dell'EN del tacchino, ma studi retrospettivi di caratterizzazione di ceppi responsabili di malattia in campo hanno evidenziato una bassa prevalenza (0-8%) di ceppi dotati del gene *netB* nel tacchino, mentre solo uno studio statunitense ha valutato la presenza del gene *tpeL* riscontrandolo solo in 1 isolato su 74 (Lyhs et al., 2013; Giovanardi et al., 2016; Smyth et al., 2022). Non è possibile escludere che la gravità delle lesioni riportate nel gruppo T03 sia imputabile all'azione di meccanismi patogenetici e tossine non ancora note. Solo con sperimentazioni in vivo utilizzando i ceppi mutati (knock-out) attraverso la delezione dei geni *netB* e/o *tpeL* potrà essere chiarito il ruolo di questi fattori di virulenza nella malattia. Inoltre, qualora la virulenza del ceppo mutato fosse dimostrata, è possibile ipotizzare il ruolo di tossine non note che potranno essere investigate su base genetica attraverso studi di whole genome sequencing.

Al contrario del pollo, nel tacchino non sono documentati molti studi di riproduzione della malattia e l'esistenza di un modello solido e affidabile per riprodurre sperimentalmente l'EN permette di approfondire importanti aspetti patogenetici e fattori predisponenti per questa specie. Inoltre, solo attraverso questo modello sperimentale è possibile testare in vivo l'efficacia di nuovi approcci e prodotti alternativi all'antimicrobico per il controllo dell'EN del tacchino.

## CONCLUSIONI

Il protocollo di induzione dell'EN proposto si è rivelato efficace nel riprodurre gli aspetti clinici, macroscopici e microscopici della malattia nel tacchino. Tale proto-

collo potrà essere utilizzato per approfondire aspetti relativi a fattori predisponenti e tossine coinvolte nella patogenesi della malattia, ma anche per valutare l'efficacia di approcci alternativi all'antimicrobico per il controllo dell'EN in questa specie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Chalmers G, Bruce HL, Hunter DB, Parreira VR, Kulkarni RR, Jiang Y, Prescott JF and P Boerlin. (2008). Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J.Clin.Microbiol.* 46(12): 3957-3964.
2. Droual R, Farver TB and AA Bickford. (1995) Relationship of sex, age, and concurrent intestinal disease to necrotic enteritis in turkeys. *Avian Dis.* 39(3): 599-605.
3. Droual R, Shivaprasad HL, and RP Chin. (1994). Coccidiosis and necrotic enteritis in turkeys. *Avian Dis.* 177-183.
4. Gholamiandehkordi AR, Timbermont L, Lanckriet A, Van Den Broeck W, Pedersen K, Dewulf J, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. and F Van Immerseel. (2007) Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 36(5): 375-382.
5. Giovanardi D, Drigo I, De Vidi B, Agnoletti F, Viel L, Capello K, Berto G and L Bano. (2016) Molecular characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased turkeys in Italy. *Avian Pathol.* 45(3): 376-380.
6. Hardy SP, Benestad SL, Hamnes IS, Moldal T, David B, Barta JR, Reperant J and M Kaldhusdal. (2020) Developing an experimental necrotic enteritis model in turkeys - the impact of *Clostridium perfringens*, *Eimeria meleagridis* and host age on frequency of severe intestinal lesions. *BMC Vet.Res.* 16(1): 63-5.
7. Hoerr FJ and JS Schrader. (2016). Histopathological assessment of gut for poultry production and applied research. *Proc. Arkansas Nutrition Conference*, pp. 1-5
8. Kaldhusdal M, Skjerve E, Hansen MK, Hamnes IS, David B, Hanssen SA and A Lovland. (2021) The incidence of necrotic enteritis in turkeys is associated with farm, season and faecal *Eimeria* oocyst counts. *BMC Vet.Res.* 17(1):292-8.
9. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI and RJ Moore. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4(2): e26.
10. Keyburn AL, Bannam TL, Moore RJ and JI Rood. (2010). NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* 2(7): 1913–1927.
11. Li C, Lillehoj HS, Gadde UD, Ritter D and S Oh. (2017). Characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from healthy and necrotic enteritis-afflicted broiler chickens. *Avian dis.* 61(2): 178-185.
12. Llanco LA, Nakano V, Ferreira AJP and MJ Avila-Campos. (2012). Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens with necrotic enteritis. *International Journal of Microbiology Research* 4(7): 290.
13. Lyhs U, Perko-Makela P, Kallio H, Brockmann A, Heinikainen S, Tuuri H,

- and K Pedersen. (2013) Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poult.Sci.* 92(7): 1750-1757.
14. Petit L, Gibert M and MR Popoff. (1999) *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7(3): 104-110.
  15. Prescott JF, Smyth JA, Shojadoost B and Vince A. (2016) Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: a review. *Avian Pathol.* 45(3): 317-322.
  16. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, Moore RJ, Popoff MR, Sarker MR, Songer JG, Uzal FA and F Van Immerseel. (2018) Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53: 5-10.
  17. Savva CG, Fernandes da Costa SP, Bokori-Brown M, Naylor CE, Cole AR, Moss DS, Titball RW and AK Basak. (2013). Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *J.Biol.Chem.* 288(5): 3512-3522.
  18. Smyth JA, Mishra N and HL Shivaprasad. (2022) Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Strains Recovered from U.S. Turkeys with Necrotic Enteritis. *Avian Dis.* 66(1): 1-4.
  19. 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.
  20. Droual R, Shivaprasad HL and RP Chin. Coccidiosis and necrotic enteritis in turkeys. *Avian Dis.* 1994;38:177-83.
  21. Wade B, Keyburn AL, Seemann T, Rood JI and RJ Moore. (2015). Binding of *Clostridium perfringens* to collagen correlates with the ability to cause necrotic enteritis in chickens. *Vet.Microbiol.* 180(3-4): 299-303.
  22. Yan X, Porter CJ, Hardy SP, Steer D, Smith AI, Quinsey NS, Hughes V, Cheung JK, Keyburn AL, Kaldhusdal M, Moore RJ, Bannam TL, Whisstock JC and JI Rood. (2013) Structural and functional analysis of the pore-forming toxin NetB from *Clostridium perfringens*. *mBio* 4(1): 19.

# COMBINAZIONE DI VACCINI SALMONELLA VIVI E INATTIVATI PER IL CONTROLLO DELLA TIFOSI AVIARE IN GALLINE OVAIOLE

Joaquim P.<sup>1</sup>, Balbiani F.<sup>1</sup>, Socas L.<sup>1</sup>, Morales H.<sup>2</sup>, Rubio J.<sup>2</sup>, Gomez M.<sup>2</sup>, Chacana P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Patobiología-UEED IPVET, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Nicolás Repetto 2799, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina;

<sup>2</sup> CALIER, Colombia and Spain.

## Summary

Fowl typhoid (FT) caused by *Salmonella* ser. Gallinarum biovar Gallinarum (SG) is a poultry disease distributed worldwide. Although it has been eradicated in commercial production of many developed countries, it still persists in developing countries of Latin American, Africa, and Asia as well as in some European countries. There are many products and strategies aimed to control the pathogen in the farms, and vaccines are frequently used to reduce mortality, clinical signs as well as vertical or horizontal transmission. There are several types of *Salmonella* vaccines such as inactivated bacterins and live attenuated strains, which may be administered during the first days of life of the chicks. New trends in the use of vaccines for the control of *Salmonella* include the combination of inactivated and live vaccines, in order to improve the protection of birds and to explore their potential for heterologous protection. In this context, the aim of this work was to assess the protection against FT conferred by vaccines based on *S. Enteritidis* (SE) or SG and their combination. Five experimental groups of 22 birds each were included: 1) inactivated vaccine formulated with SG and SE, 2) a live vaccine based on a live attenuated strain of SE, 3) a plan combining the administration of both live and inactivated vaccines, 4) a plan using the attenuated SG 9R strain, and 5) control unvaccinated birds. At 30 weeks of age, all hens were challenged with a 10<sup>6</sup> colony-forming unit of a virulent strain of SG and mortality was recorded during the subsequent 15 days. The results showed that the plan that included only the inactivated vaccine did not show significant protection ( $p=1$ ) while the plan based on the administration of the attenuated strain of SE significantly reduced mortality in the group of birds ( $p=0.0309$ ). However, highest levels of protection were obtained in the group of hens immunized with the combination of the inactivated vaccine and the live attenuated SE strain ( $p < 0.0001$ ), which was statistically similar to the homologous protection conferred by the SG 9R strain, a vaccine used in many countries to control FT. These results demonstrate that the combination of existing vaccines together with strict biosecurity measures in the farms may help to improve the control of the pathogen in countries where FT is an emerging or re-emerging disease.

## INTRODUZIONE

La tifosi aviare (FT) è una malattia setticemica causata dalla *Salmonella* Gallinarum (SG), che può essere trasmessa per via verticale o orizzontale. La malattia può generare ingenti perdite economiche negli allevamenti avicoli a causa degli elevati tassi di mortalità o della riduzione della crescita o della deposizione (Senevirathne, et al., 2022; Jeon et al., 2013). I segni clinici dell'infezione comprendono depressione, anoressia, disidratazione e diarrea (World Organization for Animal Health, 2022). L'eradicazione della malattia si ottiene solitamente con la pratica di adeguati programmi di allevamento, volti principalmente a controllare la trasmissione verticale negli allevamenti di riproduttori. I costi economici associati alla malattia compren-

dono l'abbattimento e sostituzione delle linee parentali, nonché l'investimento in programmi di sorveglianza (Shivaprasad, 2000). La vaccinazione è una delle strategie più accettate per prevenire e controllare la FT. Il ceppo vaccinale SG9R è largamente il più utilizzato al mondo per prevenire la malattia (Beylefeld and Abolnik, 2023; Senevirathne et al., 2022). Sebbene la sua efficacia sia stata ampiamente dimostrata, vi è una certa preoccupazione in merito al suo utilizzo, ad esempio la variabilità della sua efficacia protettiva nei confronti di diverse razze, la persistenza del ceppo nelle galline immunizzate che può portare alla sua trasmissione attraverso le uova e la virulenza residua che può indurre la tifosi aviaria in giovani uccelli (Kim et al., 2021; Kwon and Cho, 2011). D'altro canto, in tutto il mondo sono disponibili diversi vaccini vivi attenuati per controllare la Salmonella, per lo più basati sui sierotipi Enteritidis o Typhimurium, che possono stimolare sia la risposta immunitaria mucosale che quella cellulosa-mediata. È stato riportato che questi ceppi attenuati possono anche fornire protezione contro altri sierotipi (Akter et al., 2022). Inoltre, sul mercato sono disponibili diversi vaccini inattivati per controllare tale patogeno e la maggior parte di essi include S. Enteritidis e/o S. Typhimurium nella propria formulazione (Crouch et al, 2020). La combinazione di piani vaccinali con vaccini sia vivi che inattivati è oggi una pratica comune, al fine di migliorare i benefici di ciascun tipo di immunogeno come riportato da Huberman et al (2020) o Arborali et al (2017), sebbene la loro implementazione in allevamento non sempre sia basata su prove scientifiche. Pertanto, considerando il potenziale della combinazione di diversi vaccini per migliorare la protezione contro la FT, lo scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare l'efficacia di differenti piani vaccinali comprendenti vaccini eterologhi o omologhi inattivati e vivi attenuati contro l'infezione da SG in galline ovaiole.

## **MATERIALI E METODI**

### *Animali e condizioni di allevamento*

I pulcini femmine di un giorno della linea di ovaiole Brown Classic (n = 110) sono stati ottenuti da un incubatoio commerciale in Argentina. All'arrivo, gli uccelli sono stati assegnati a 5 gruppi sperimentali e alloggiati in recinti di 1 x 1 m su trucioli di legno. Dalla 12a settimana di vita gli uccelli sono stati alloggiati in gabbie di 50 cm x 75 cm (3 uccelli per gabbia) fino alla fine della prova. Recinti e gabbie erano situati in strutture di livello 2 di biosicurezza. L'analisi batteriologica dei tamponi cloacali ha confermato che gli uccelli erano esenti da Salmonella. Durante lo studio, gli uccelli hanno ricevuto acqua e mangime commerciale senza antibiotici e coccidiostatici ad libitum.

### *Vaccini e procedure di vaccinazione.*

All'interno dello studio sono stati presi in considerazione tre vaccini: una batterina bivalente formulata con ceppi di S. Gallinarum (SG) e S. Enteritidis (SE) inattivati con formalina e adiuvante acquoso (SALMONELL-BAC® HIDROSA, CALIER), somministrata per via intramuscolare nel muscolo pettorale, un vaccino vivo attenuato formulato con ceppo SE CAL 10 Sm+/Rif+/Ssq- (PRIMUN® SALMONELLA E, CALIER) somministrato mediante sonda gastrica, e vaccino vivo attenuato ceppo SG 9R somministrato per via sottocutanea dietro il collo. Tutti i vaccini sono stati preparati, conservati e somministrati secondo le raccomandazioni del produttore.

### *Disegno sperimentale*

Nello studio sono stati inclusi cinque gruppi sperimentali di 22 uccelli ciascuno.

Gruppo vaccinato 1: gli uccelli sono stati inoculati con 2 dosi del vaccino bivalente inattivato alle settimane 8 e 12 (0,25 ml);

Gruppo vaccinato 2: gli uccelli hanno ricevuto 4 dosi di vaccino SE vivo attenuato al giorno 1 di vita (0,2 ml) e alle settimane 8, 16 e 26 (0,5 ml);

Gruppo vaccinato 3: vaccinato con 3 dosi di vaccino vivo attenuato SE ai giorni 1 (0,2 ml) e alle settimane 8 e 16 (0,5 ml) e 2 dosi di vaccino bivalente inattivato alle settimane 8 e 12 (0,25 ml);

Gruppo vaccinato 4: gli uccelli sono stati inoculati con 2 dosi del vaccino vivo attenuato SG9R alle settimane 6 e 16 (0,2 ml);

Gruppo non vaccinato: uccelli non vaccinati sono stati inclusi come controllo.

#### *Ceppo infettivo e preparazione dell'inoculo*

Il test è stato effettuato utilizzando il ceppo di *S. Gallinarum* INTA 91, precedentemente isolato da galline ovaiole in Argentina (Chacana e Terzolo, 2006).

#### *Infezione sperimentale*

A 28 settimane di vita, gli uccelli di tutti i gruppi sperimentali sono stati inoculati individualmente con il ceppo infettivo di SG. Ciascun uccello ha ricevuto 1 ml dell'inoculo tramite sonda gastrica nel gozzo (dose di prova=106 cfu). La mortalità è stata registrata quotidianamente in tutti i gruppi durante i 14 giorni successivi all'infezione sperimentale. Tutti gli uccelli morti sono stati sottoposti a necropsia e sono stati prelevati campioni di fegato per la rilevazione batteriologica e molecolare dell'agente patogeno, al fine di confermare la morte per tifo aviario. Il giorno 14 dopo l'infezione, tutti gli uccelli rimasti in vita sono stati sottoposti ad eutanasia mediante dislocazione cervicale, 5 uccelli di ciascun gruppo sperimentale sono stati inoltre sottoposti a necropsia e prelievo di campioni di fegato.

#### *Analisi batteriologiche e molecolari*

Ciascun campione di fegato (1 g) è stato incubato in 10 ml di brodo di acqua peptonata all'1%. Dopo 18 ore di incubazione a 37°C, un'aliquota del brodo è stata coltivata su piastre di agar BG registrando l'isolamento della *Salmonella*. Inoltre, il rilevamento della *Salmonella* è stato eseguito mediante Real Time PCR.

#### *Analisi statistica*

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software GraphPad Prism 5. Le differenze tra le percentuali di mortalità a 14 giorni post-infezione sono state analizzate utilizzando il test di Fisher con un livello di significatività pari a 0,05.

## **RISULTATI**

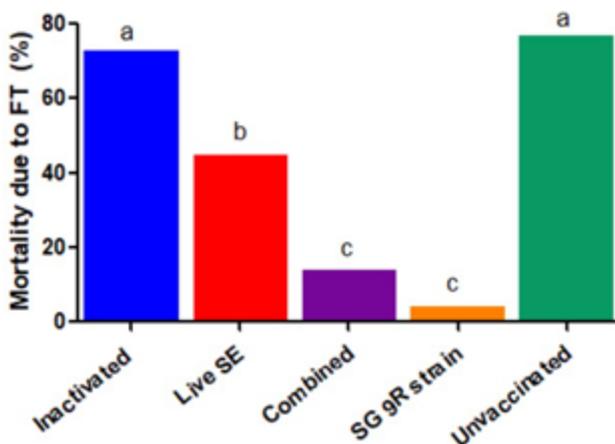
#### *Considerazioni generali*

Tutti gli uccelli sono risultati negativi alla *Salmonella* per l'intera durata dello studio fino all'infezione sperimentale, così come sono risultati normali sia il comportamento che il consumo di acqua e cibo. Dopo l'infezione, e circa 24 ore prima della morte per tifo aviario, gli uccelli hanno iniziato a mostrare un decadimento generale, una mancanza di risposta agli stimoli, e in alcuni di essi sono state osservate anche piume arruffate e diarrea.

#### *Mortalità dopo l'infezione*

I tassi di mortalità in tutti i gruppi sperimentali sono mostrati rispettivamente nella Figura 1. A 14 giorni post-infezione non sono state osservate differenze significative tra gli uccelli vaccinati

solo con la batterina inattivata e gli uccelli non vaccinati ( $P=1,00$ ), ma la mortalità è stata significativamente ridotta nel gruppo che ha ricevuto solo il vaccino vivo attenuato SE ( $P=0,031$ ). Una maggiore riduzione della mortalità è stata riscontrata nel gruppo di uccelli vaccinati con la combinazione del vaccino SE inattivato e vivo e del vaccino vivo attenuato SG (in entrambi i casi,  $P < 0,0001$  rispetto al gruppo non vaccinato). D'altra parte, non sono state osservate differenze significative nella mortalità tra gli uccelli immunizzati con il piano vaccinale combinato e con il vaccino vivo SG ( $P = 0,3035$ ).



**Figura 1.** Tasso di mortalità per tifosi aviare. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative.

#### *Presenza di Salmonella nel fegato*

*S. Gallinarum* è stato rilevato nei fegati di tutte le galline morte dopo l'infezione sperimentale. Negli uccelli sopravvissuti del gruppo di controllo l'agente patogeno è stato isolato in 2/5 (40%) e rilevato in 1/5 (20%) mediante Real Time PCR. Al contrario, i campioni di fegato analizzati degli uccelli sopravvissuti appartenenti agli altri gruppi sperimentali sono risultati negativi per l'isolamento o la rilevazione molecolare di SG.

## **DISCUSSIONE**

**Abbiamo confrontato le prestazioni di diversi tipi di vaccini nel ridurre la mortalità dovuta alla tifosi aviare in galline ovaiole infettate sperimentalmente con un ceppo virulento di SG precedentemente utilizzato in altri studi (Chacana e Terzolo, 2006; Casanova et al., 2021).** Tra i piani vaccinali testati, abbiamo incluso una batterina bivalente formulata con *S. Gallinarum* e *S. Enteritidis* inattivati, un vaccino vivo basato su un ceppo attenuato di *S. Enteritidis*, una combinazione di entrambi i vaccini e anche l'omologo ceppo vivo attenuato SG 9R. Come previsto, la dose di 106 unità formanti colonie è stata in grado di produrre i tipici segni clinici acuti e la mortalità della FT, emulando una tipica epidemia di FT (Barrows e Freitas Neto 2011). Dopo l'infezione sperimentale, la setticemia era presente in ogni gallina morta ed è stata riscontrata una completa corrispondenza tra mortalità e colonizzazione degli organi.

Non è stata osservata alcuna protezione quando gli uccelli sono stati immunizzati solo con il vaccino inattivato, sebbene nella sua formulazione includesse SG insieme a SE. I vaccini inattivati possono essere uno strumento utile per ridurre la diffusione e l'invasione della Salmonella non tifoidea, ma secondo Paiva et al (2009), la loro protezione potrebbe essere notevolmente ridotta nei confronti della SG patogena invasiva. Inoltre, secondo Huberman (2022), i vaccini inattivati possono produrre buone risposte immunitarie ma generalmente mancano di protezione contro i sierotipi invasivi.

Al contrario, il piano vaccinale che includeva solo il vaccino vivo per SE è stato in grado di ridurre significativamente la mortalità dovuta a FT. Una protezione incrociata simile è stata osservata da Chacana e Terzolo (2006) che hanno riportato la protezione di un vaccino vivo SE in galline infettate con SG circa 12 settimane dopo l'ultima vaccinazione. Gli autori suggeriscono che alcuni ceppi attenuati di SE sono in grado di proteggere contro la mortalità e la colonizzazione degli organi, e possono ridurre il tasso di escrezione fecale, diminuendo quindi la diffusione della SG nell'ambiente durante il periodo in cui il microrganismo viene escreto. Entrambi i sierotipi appartengono infatti al sierogruppo D1, il che potrebbe spiegare anche la protezione conferita dal vaccino SE. Inoltre, Thomson et al (2008) sostengono che SG si sia evoluta da un antenato di SE ed essi potrebbero quindi condividere alcuni geni di virulenza.

Tuttavia, nel nostro studio il grado di protezione più elevato è stato ottenuto dalla combinazione del vaccino SE inattivato e vivo, che è stato significativamente maggiore rispetto alla protezione osservata quando veniva somministrato solo il vaccino vivo. Infatti, la combinazione di entrambi i vaccini è stata in grado di conferire un tasso di protezione simile a quello della vaccinazione con il ceppo omologo SG 9R. Inoltre, ci sono alcuni vantaggi legati all'utilizzo del vaccino vivo SE. Ad esempio, il vaccino può essere somministrato fin dal primo giorno di vita dei pulcini, il che consente una rapida colonizzazione dell'intestino da parte di ceppi attenuati che possono inibire rapidamente l'adesione della Salmonella patogena all'epitelio entro 24 ore (Van Immerseel et al., 2005). Al contrario, la vaccinazione SG9R è solitamente raccomandata dalle 6 settimane di età in poi poiché può ridurre il tasso di crescita nei giovani pulcini, con conseguente mancanza di protezione contro SG o altri sierotipi durante uno dei periodi più sensibili per gli uccelli (Kim et al., 2021). Inoltre, la potenziale reversione del ceppo SG9R al suo stato virulento non è chiara. Mentre alcuni autori hanno riferito che nessun focolaio di FT è stato causato dal ceppo SG 9R (Koerich et al., 2018) o che non è stata osservata alcuna reversione (Okamoto et al, 2010), altri autori suggeriscono che gli isolati di campo di SG potrebbero avere un'origine correlata al ceppo 9R (Kwon e Cho, 2011; Van Immerseel et al., 2013).

## **CONCLUSIONI**

In conclusione, i nostri risultati hanno dimostrato che la combinazione di vaccini vivi e inattivati contro la Salmonella può essere una buona opzione da includere in un piano di controllo della FT. Bisogna però considerare che le misure di biosicurezza rappresentano la prima e più importante barriera per evitare il contagio dei volatili da parte della SG e la sua diffusione tra gli allevamenti. Pertanto, la vaccinazione deve essere inclusa come strumento nel contesto di un programma olistico volto al controllo di questo e di altri sierotipi di Salmonella lungo tutta la catena della produzione avicola.

## BIBLIOGRAFIA

1. Akter T, Nooruzzaman M, Belal SMSH, Ahammed M, Uddin AJ, Parvin R, et al. Fowl typhoid live lyophilized vaccine applied at 3-month intervals protected layer chickens from *Salmonella Gallinarum* infection and prevented cloacal shedding. *J Adv Vet Anim Res.* 2022;9(2):301-9.
2. Alborali GL, Ruggeri J, Pesciaroli M, Martinelli N, Chirullo B, Ammendola S, et al. Prime-boost vaccination with attenuated *Salmonella Typhimurium*  $\Delta$ znuABC and inactivated *Salmonella Choleraesuis* is protective against *Salmonella Choleraesuis* challenge infection in piglets. *BMC Vet Res.* 2017;13:284.
3. Barrow PA, Freitas Neto OC. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.* 2011;40(1):1-13.
4. Beylefeld A, Abolnik C. *Salmonella Gallinarum* strains from outbreaks of fowl typhoid fever in Southern Africa closely related to SG9R vaccines. *Front Vet Sci.* 2023;10.
5. Casanova NA, Redondo LM, Redondo EA, Joaquim PE, Dominguez JE, Fernández-Miyakawa ME, et al. Efficacy of chestnut and quebracho wood extracts to control *Salmonella* in **poultry**. *J Appl Microbiol.* 2021;131(1):135-45.
6. Chacana PA, Terzolo HR. Protection conferred by a live *Salmonella Enteritidis* vaccine against fowl typhoid in laying hens. *Avian Dis.* 2006;50(2):280-3.
7. Crouch CF, Nell T, Reijnders M, Donkers T, Pugh C, Patel A, et al. Safety and efficacy of a novel inactivated trivalent *Salmonella enterica* vaccine in chickens. *Vaccine.* 2020;38(43):6741-50.
8. Huberman YD, Caballero-García M, Rojas R, Ascanio S, Olmos LH, Malena R, et al. The efficacy of a trivalent inactivated *Salmonella* vaccine combined with the live *S. gallinarum* 9R vaccine in young layers after experimental infections with *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, and *S. infantis*. *Vaccines.* 2022;10(7):1113.
9. Jeon BW, Nandre RM, Lee JH. Oral immunization with an attenuated *Salmonella Gallinarum* mutant as a fowl typhoid vaccine with a live adjuvant strain secreting the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *BMC Vet Res.* 2013;9:1-8.
10. Kim NH, Ko DS, Ha EJ, Ahn S, Choi KS, Kwon HJ. Optimized detoxification of a live attenuated vaccine strain (SG9R) to improve vaccine strategy against fowl typhoid. *Vaccines.* 2021;9(2):122.
11. Koerich PKV, Fonseca BB, Balestrin E, Tagliari V, Hoepers PG, Ueira-Vieira C, et al. *Salmonella Gallinarum* field isolates and its relationship to vaccine strain SG9R. *Br Poult Sci.* 2018;59(2):154-9.
12. Kwon HJ, Cho SH. Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. *Vaccine.* 2011;29:1311-8.
13. Okamoto AS, Menconi A, Gonçalves GAM, Rocha TS, Andreatti Filho RF, Savano EN, et al. Reversion to virulence evaluation of a 9R vaccine strain of *Salmonella enterica* serovar gallinarum in commercial brown layers. *Rev Bras Ciência Avícola.* 2010;12(1):47-52.
14. Paiva JB, Penha Filho RAC, Argüello YMS, Silva MD, Gardin Y, Resende F, et al. Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella gallinarum* in commercial brown layer and broiler breeder hens. *Rev Bras Ciência Avícola.* 2009;11(1):65-72.
15. Senevirathne A, Hewawaduge C, Lee JH. Assessing an O-antigen deficient, live attenuated *Salmonella Gallinarum* strain that is DIVA compatible, environmentally safe, and protects chickens against fowl typhoid. *Dev Comp Immunol.* 2022;133:104433.
16. Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev Sci Tech.* 2000;19(2):405-24.

17. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, et al. Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res.* 2018;18(10):1624-37.
18. Van Immerseel F, Studholme DJ, Eeckhaut V, Heyndrickx M, Dewulf J, Dewaele I, et al. *Salmonella Gallinarum* field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. *Vaccine.* 2013;31(43):4940-5.
19. World Organization for Animal Health. Fowl typhoid and pullorum disease. Chapter 3.3.11 in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2022*, 8th Edn (Office international des epizooties). Available online at <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/> (accessed December 1, 2023).

# MUCISPIRILLUM SCHAEGLERI COME POSSIBILE BIOMARKER DELLA SALUTE INTESTINALE DEI POLLI

Borrelli L.<sup>1,4</sup>, Coretti L.<sup>2,4</sup>, Turco L.<sup>3</sup>, Santaniello A.<sup>1</sup>, Lembo F.<sup>2,4</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>, Dipineto L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Delpino 1, 80137 Napoli, Italia;

<sup>2</sup> Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131 Napoli, Italia;

<sup>3</sup> Dipartimento Di Medicina Di Precisione, Università degli studi della Campania Luigi Vanvitelli, Via de Crecchio 7 80138 Napoli, Italia;

<sup>4</sup> TaskForce on Microbiome Studies, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università, 80055 Portici, Italia

## Summary

Characterizing the gut microbiota of free-range and alternative poultry production systems provides information useful for improving poultry welfare, performance, and environmental sustainability. In this study we characterized the composition, diversity, and predicted functions of the caecal microbiota community present in free-range broilers over their lifespan by 16S rDNA high-throughput Illumina 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. Among the minor phyla associated with a healthy gut, we have highlighted the presence of *Deferribacterota* and, at the species level, of *Mucispirillum schaedleri* following the outdoor access period. In detail, Amplicon Sequence Variants (ASVs) annotated as *M. schaedleri* were absent in the indoor group and detected exclusively in the cecum of all free-range chickens with a mean proportion of 1.44% ( $p=0.00012$  for I vs O comparison after Bonferroni correction). Moreover, KEGG functions involved in butyrate production were predicted as enriched in O group. These gene functions were found to be positively correlated with *M. schaedleri* abundance levels. There is still little and conflicting information in the scientific literature, but this bacterium is known to have a mucus-associated niche in the gut, and thus, in light of our data obtained, it could be considered an interesting bacterial marker chicken gut health.

## INTRODUZIONE

L'intestino dei polli ospita una comunità microbica diversificata che interagisce strettamente con l'ospite che fornisce una nicchia e nutrienti per la crescita o la proliferazione microbica. La composizione del microbiota intestinale dei polli da carne è ritenuta un importante fattore determinante per il benessere, le prestazioni e l'impatto ambientale degli animali e una maggiore diversità microbica è fondamentale per garantire lo stato di salute dell'ospite, perché svolge un ruolo vitale nel metabolismo, nella regolazione del sistema immunitario e nell'esclusione competitiva di organismi patogeni. Molti fattori influenzano la diversità e la composizione del microbiota intestinale del pollame, come la dieta, le condizioni di allevamento, la genetica dell'ospite e l'età. Dieta

e sistemi di allevamento sono stati identificati come fattori chiave che contribuiscono alla diversità microbica, ma sono necessari ulteriori studi per comprendere l'importanza dei diversi sistemi di allevamento, in particolare quelli all'aperto dove gli studi sono ancora scarsi. In un nostro studio precedente abbiamo caratterizzato la composizione, la diversità e le funzioni previste della comunità del microbiota cecale presente nei polli da carne allevati all'aperto nel corso della loro vita, utilizzando tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS). L'intento era quello di ampliare la nostra comprensione dei fattori responsabili del cambiamento della composizione del microbiota. Dai diversi dati ottenuti abbiamo evidenziato inaspettatamente la presenza dei Deferribacterota tra i phyla minori e, a livello di specie, di *Mucispirillum schaedleri*, solo nei polli allevati all'aperto (Varriale et al., 2022) e che qui, in questo studio abbiamo ritenuto importante sottolineare. *Mucispirillum schaedleri* (Mu.ci.spi'ril.lum. L. n. mucus mucus; N.L. dim. neut. n. spirillum; N.L. neut. n. *mucispirillum* un piccolo bastoncino a spirale del muco; schaed'ler.i. N.L. gen. n. *schaedleri* di Schaedler, in onore di Russell Schaedler, uno dei pionieri nello studio dei batteri del tratto intestinale dei mammiferi) (Deferribacteraceae) è un batterio spiraliforme, flagellato, Gram-negativo, anaerobio obbligato, descritto per la prima volta nel 1987 come "spirocheta" (Desjardins et al., 2023). La sua designazione originale, "Altered Schaedler Flora ceppo 457" (ASF 457), si riferisce al suo inserimento in comunità modello di microrganismi sviluppata da R.P. Orcutt e utilizzata dalla fine degli anni Settanta. I microrganismi che compongono l'ASF sono tutti derivati da topi, possono essere coltivati in vitro e sono passati in modo stabile attraverso più generazioni (almeno 15 anni o più, secondo gli autori) in topi gnotobiotici allevati continuamente in strutture di isolamento. *Mucispirillum schaedleri* è incluso in consorzi forniti in commercio utilizzati per stabilire comunità batteriche presumibilmente standardizzate. *M. schaedleri* oltre ad essere un membro prevalente del microbiota intestinale dei topi è anche un membro a bassa abbondanza del microbiota intestinale umano (Desjardins et al., 2023; Wymore Brand et al., 2015; Herp et al., 2023). I dati disponibili in letteratura scientifica circa la presenza e il ruolo di *M. schaedleri* negli avicoli sono scarsi e si riferiscono principalmente a sistemi di allevamenti free-range e biologici, limitandosi solo a riportarlo tra la comunità microbica intestinale dei polli allevati all'aperto. In un altro studio condotto da Wen et al. (2019), è stato osservato che la specie *M. schaedleri* era significativamente associata a una minore massa grassa addominale e a un minor peso corporeo dei polli. Una recente previsione del genoma ha dimostrato che *M. schaedleri* utilizza monosaccaridi, oligopeptidi, aminoacidi e SCFA come substrati per il suo metabolismo energetico, mentre ha una capacità estremamente limitata di degradare i polisaccaridi. È quindi probabile che questo microrganismo serva come consumatore di prodotti di degradazione prodotti da microbioti idrolitici o fermentativi (Wen et al., 2019). Questo dato risulta interessante considerando che l'eccessivo deposito di grasso addominale è un problema diffuso nella produzione avicola, perché non solo riduce l'efficienza alimentare e la resa delle carcasse commestibili, ma provoca anche un calo dei consumi e l'insoddisfazione dei consumatori. Ogni anno in tutto il mondo i polli da carne producono circa tre milioni di tonnellate di grasso addominale che vengono scartate durante la lavorazione. Pertanto, le perdite economiche associate a questo problema sono stimate in oltre 2,7 miliardi di dollari. Questi risultati forniscono approfondimenti sul ruolo complesso del microbiota intestinale e contribuiscono allo sviluppo di strategie per alterare il microbiota intestinale al fine di controllare la

deposizione di grasso durante la produzione di broiler. Inoltre, risulta di particolare importanza uno studio in cui si riporta che *M. schaedleri*, un membro prevalente del microbiota murino, protegge i topi dall'infezione e dalla colite da *Salmonella* enterica serovar Typhimurium, interferendo con l'invasione del patogeno e l'espressione dei fattori di virulenza. L'analisi di metatranscriptomica fatta in vivo, suggerisce che i due batteri abitano una nicchia comune nell'intestino e competono per nutrienti simili, in particolare idrogeno e nitrato. In particolare, *Salmonella* Typhimurium può invadere le cellule epiteliali intestinali utilizzando un sistema di secrezione batterica di tipo 3 codificato nell'isola di patogenicità 1 di *Salmonella* (T3SS-1) che consente la traslocazione dei fattori di virulenza direttamente nelle cellule epiteliali dell'ospite innescando l'invasione di *Salmonella* Typhimurium e le risposte infiammatorie. Gli autori hanno dimostrato che la respirazione dei nitrati aumenta l'espressione dei geni di *Salmonella* Typhimurium T3SS-1 in vitro in condizioni anaerobiche e che l'espressione di SPI1-T3SS risultava marcatamente ridotta in presenza di *M. schaedleri*, in vivo, come dimostrato dai dati RNAseq. Pertanto, gli autori hanno ipotizzato che *M. schaedleri* può bloccare l'espressione dei geni di invasione di *Salmonella* Typhimurium competendo per il nitrato nell'intestino. Infine, *M. schaedleri* è in grado di alterare le concentrazioni intestinali di Short Chain Fatty Acids (SCFA) nei topi, riducendo le quantità di acetato e propionato negli animali colonizzati. Gli SCFA e gli acidi biliari hanno dimostrato di essere importanti spunti ambientali per l'espressione di SPI1-T3SS, dove l'acetato induce l'espressione di SPI1-T3SS, mentre il butirato e il propionato mostrano un effetto inibitorio (Herp et al., 2023). Pertanto, alla luce di questi pochi ma interessanti dati rinvenuti, con il nostro studio abbiamo ritenuto opportuno sottolineare la presenza di *M. schaedleri* nel microbiota intestinale di polli allevati all'aperto e indagare anche sulle funzioni geniche ad esso correlate circa la produzione di SCFA. Questo batterio, noto per avere una nicchia associata al muco nell'intestino, con tutte le caratteristiche sopra descritte, può essere considerato un biomarcatore della salute intestinale anche nelle specie avicole, in particolare nei polli da carne.

## **MATERIALI E METODI**

In questo studio sono stati utilizzati 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 porzioni 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. Sono stati selezionati casualmente un totale di 18 polli, durante l'intero periodo produttivo, 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 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). I dati relativi alle sequenze sono stati importati nel software QIIME2 (v2021.4) per l'analisi. Le letture sono state filtrate, tagliate e controllate per le chimere utilizzando il plugin DADA2 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. Le differenze tra i gruppi a livello di specie sono state determinate attraverso il test t di Student corretto con il Test di Bonferroni). La correlazione di Pearson è stata poi utilizzata per associare l'abbondanza di *M. schaedleri* con quella delle altre specie batteriche con livelli significativamente diversi tra i due gruppi. Il profilo metagenomico funzionale in ciascun campione è stato studiato mediante PICRUSt2 (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states), focalizzando l'attenzione sull'analisi di dell'abbondanza di KEGGs (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ortholog) relative alla formazione dei principali acidi grassi a catena corta (SCFAs).

## RISULTATI

Per i campioni sequenziati abbiamo ottenuto un totale di 18,473 sequenze assegnate in 3 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%). Sono state osservate differenze significative nella composizione del microbiota cecale dei polli a 28 giorni di età (gruppo Indoor) e a 56 giorni di età (gruppo Outdoor). Il gruppo Outdoor ha mostrato una comunità microbica più ricca e complessa, caratterizzata dalla comparsa di nuovi phyla come Deferribacterota e Synergistota, mentre il gruppo Indoor ha mostrato un aumento di Campylobacterota. Tra i phyla minori associati a un intestino sano, abbiamo evidenziato la presenza di Deferribacterota e, a livello di specie, di *Mucispirillum schaedleri* dopo il periodo di accesso all'aperto. Questa osservazione è in linea con pochi studi che descrivono la comunità microbica dei polli allevati all'aperto. In particolare, ASVs annotate come *M. schaedleri* sono state identificate esclusivamente nei campioni prelevati dal gruppo Outdoor. La proporzione di *M. schaedleri* nel gruppo Outdoor si è rivelata quindi significativamente più elevata rispetto al gruppo Indoor, (1.44% e 0% rispettivamente,  $p=0.00012$  dopo correzione con Bonferroni) (Fig.1 A). Inoltre, la presenza di *M. schaedleri* è risultata negativamente correlata con i livelli di *Barnesiella viscericola* ed *Eubacterium coprostanoligenes*. L'analisi di predizione del metagenoma ha evidenziato un arricchimento significa-

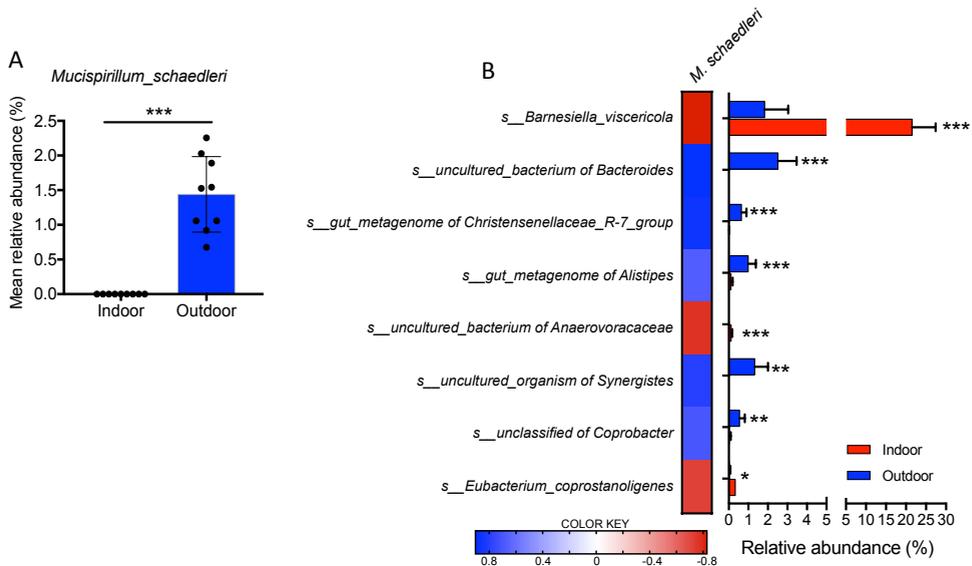
tivo nel gruppo Outdoor delle conte di funzioni enzimatiche coinvolte nella produzione di butirrato (K00634, fosfato butirril-transferasi:  $590.8 \pm 207.9$  e  $1147.1 \pm 490.9$  in I e O, rispettivamente,  $p < 0.01$ ; K00929, butirrato chinasi:  $622.7 \pm 208.9$  e  $1200.9 \pm 506.9$  in I e O, rispettivamente,  $p < 0.01$ ; K01034, acetato CoA-transferasi subunità alfa:  $40.6 \pm 24.3$  e  $141.5 \pm 82.7$  in I e O, rispettivamente,  $p < 0.01$ ). Queste tre funzioni geniche sono risultate positivamente correlate ai livelli di abbondanza di *M. schaedleri*.

## DISCUSSIONE

Il presente studio ha evidenziato che la comunità del microbiota cecale dei polli free-range era notevolmente diversa prima e dopo l'accesso all'aperto, quando sono stati introdotti nella dieta diversi tipi di risorse ambientali, come erbe e insetti. Potremmo ipotizzare che la maggiore diversità della comunità microbica e la comparsa di altri taxa come *Mucispirillum schaedleri*, possa essere associati a un intestino sano. Come riportato dall'analisi di predizione metagenomica, i livelli di abbondanza di *M. schaedleri* sono stati positivamente correlati a tre funzioni enzimatiche coinvolte nella produzione di butirrato. Il butirrato ha numerosi effetti benefici sui tessuti intestinali e sulla salute dell'intestino nei polli, in quanto è una fonte energetica essenziale per lo sviluppo e la proliferazione dell'epitelio gastrointestinale. Inoltre, l'acido butirrico riduce la colonizzazione di batteri nocivi abbassando il pH intestinale, influenza la morfologia degli organi digestivi e linfatici e migliora l'efficienza alimentare e l'aumento di peso (Xiao et al., 2023). Pertanto, riteniamo che *M. schaedleri* potrebbe essere un promettente marcatore batterico intestinale per la salute dell'ospite. I nostri risultati suggeriscono che i sistemi di produzione alternativi con accesso all'aperto possono svolgere un ruolo cruciale nella creazione di un microbiota intestinale sano. Anche la dieta e altri fattori ambientali rappresentano potenti modulatori del microbioma intestinale e sono necessarie ulteriori indagini per capire meglio come possiamo sfruttare responsabilmente questo ecosistema interno per rendere gli animali più sani, ridurre l'uso e la dipendenza da antimicrobici negli allevamenti e prevenire la resistenza agli antimicrobici per una salute ambientale. Per rispondere alla domanda se *M. schaedleri* può essere considerato un biomarker e utilizzato come possibile probiotico per promuovere la salute intestinale dei polli, è necessario condurre ulteriori ricerche. I dati restano ancora scarsi e quello che sappiamo è che è in grado di colonizzare l'intestino dei polli, ma per averne ulteriori conferme bisogna procedere con studi di distribuzione all'interno della popolazione, attraverso tecniche di sequenziamento profondo di campioni intestinali.

## CONCLUSIONI

In conclusione, l'identificazione dei batteri associati all'ospite, come *M. schaedleri*, che possono mediare la resistenza a possibili infezioni è essenziale per studiare la loro influenza sui patogeni a livello funzionale e comprendere i nessi causali in questa complessa interazione. La modulazione dell'espressione dei fattori di virulenza è un meccanismo finora sconosciuto di protezione dall'infezione da patogeni mediata dal microbiota, e in questo caso i polli provenienti da allevamenti free-range potrebbero essere considerati anche ottimi modelli per comprendere meglio questo meccanismo.



**Figura 1.** A) Abbondanza relativa di *M. schaedleri* nei polli Indoor e Outdoor ( $p < 0.001$ ) che è risultato assente in tutti i campioni del gruppo Indoor e presente in quelli Outdoor. B) Specie batteriche significative che correlano negativamente e positivamente con *M. schaedleri* sulla base della correlazione di Pearson. A sinistra: Heatmap evidenzia le specie batteriche con più alta (blu) e più bassa (rossa) correlazione con *M. schaedleri*. 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 test di Bonferroni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F, Chiariotti L, Nizza A, Lembo F, Fioretti A. (2017). Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Sci Rep.* 7(1):16269.
2. Desjardins A, Zerfas P, Filion D, Palmer RJ Jr, Falcone EL. (2023). *Mucispirillum schaedleri*: Biofilm Architecture and Age-Dependent Pleomorphy. *Microorganisms.* 11(9):2200
3. Herp S, Brugiroux S, Garzetti D, Ring D, Jochum LM, Beutler M, Eberl C, Husain S, Walter S, Gerlach RG, Ruscheweyh HJ, Huson D, Sellin ME, Slack E, Hanson B, Loy A, Baines JF, Rausch P, Basic M, Bleich A, Berry D, Stecher B. (2019). *Mucispirillum schaedleri* Antagonizes Salmonella Virulence to Protect Mice against Colitis. *Cell Host Microbe.* 25(5):681-694.e8.
4. Variiale L, Coretti L, Dipineto L, Green BD, Pace A, Lembo F, Menna LF, Fioretti A, Borrelli L. (2022). An Outdoor Access Period Improves Chicken Cecal Microbiota and Potentially Increases Micronutrient Biosynthesis. *Front Vet Sci.* 9:904522.
5. Weiss GA, Chassard C, Hennet T. (2014). Selective proliferation of intestinal *Barnesiella* under fucosyllactose supplementation in mice. *Br J Nutr.* 111(9):1602-10.

6. Wen C, Yan W, Sun C, Ji C, Zhou Q, Zhang D, Zheng J, Yang N. (2019). The gut microbiota is largely independent of host genetics in regulating fat deposition in chickens. *ISME J.* 13(6):1422-1436.
7. Wymore Brand M, Wannemuehler MJ, Phillips GJ, Proctor A, Overstreet AM, Jergens AE, Orcutt RP, Fox JG. (2015). The Altered Schaedler Flora: Continued Applications of a Defined Murine Microbial Community. *ILAR J.* 56(2):169-78.
8. Xiao C, Zhang L, Zhang B, Kong L, Pan X, Goossens T, Song Z. (2023). Dietary sodium butyrate improves female broiler breeder performance and offspring immune function by enhancing maternal intestinal barrier and microbiota. *Poult. Sci* 102(6):102658.

# VALUTAZIONE IN VITRO DELL'EFFICACIA ANTIMICROBICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI CANNELLA NEI CONFRONTI DI STIPI TI *APEC* (*AVIAN PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI*)

Casalino G., Camarda A., Bozzo G., Dinardo F.R., Bove A., Romito D., Dimuccio M.M., Circella E.

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

## Summary

Colibacillosis is caused in avian species by *APEC* (*Avian Pathogenic Escherichia coli*) strains and is a frequent and relevant bacterial disease in the poultry industry. Prevention is based on the control of managerial and environmental predisposing factors, biosecurity measures and the use of the vaccine against O78, which represents the serogroup mainly involved and spread. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial efficacy of cinnamon essential oil against *APEC* strains isolated from laying hens that died of colibacillosis. The values of MIC<sub>90</sub> (minimum concentration inhibiting 90% of strains) and MIC<sub>50</sub> (minimum concentration inhibiting 50% of strains) of the essential oil were evaluated. Ninety-one strains belonging to serogroups O78 (40 strains), O2 (33), O128 (7) and O139 (11) were tested in bacterial densities of both 10<sup>8</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/mL. The MIC<sub>90</sub> and MIC<sub>50</sub> values were 0.5 and 0.4 µL/mL, respectively, for the bacteria analysed with density of 10<sup>8</sup> CFU/mL while they were 0.4 and 0.3 µL/mL for bacterial density of 10<sup>6</sup> CFU/mL. Therefore, cinnamon essential oil seems to be effective, even with low concentrations, in inhibiting *APEC* strains and could potentially be used, after further trials in field conditions, for the prevention of colibacillosis in poultry.

## INTRODUZIONE

La colibacillosi, causata da *Escherichia coli* (*E. coli*), è di interesse rilevante nel settore avicolo industriale in quanto responsabile di perdite economiche legate alla mortalità e ai cali produttivi che si registrano nei flocks di animali colpiti. Le forme cliniche di colibacillosi sono numerose e, tra queste ritroviamo le onfaliti dei pulcini, le oviduttiti, le forme setticemiche, le forme respiratorie con aerosacculiti e coinvolgimento di altre sierose che si riscontrano sia nei broilers che nelle galline ovaiole (Nolan et al., 2020), e possibili lesioni in altre sedi. Pur essendo una malattia condizionata da una inappropriata gestione dei gruppi allevati, alcuni ceppi di *E. coli*, in particolare appartenenti a determinati sierotipi e muniti di geni codificanti per fattori di virulenza (La Ragione e Woodward, 2002; Schouler et al., 2012), sono più frequentemente responsabili della colibacillosi. Tali stipti sono definiti, nelle specie aviari, *Avian Pathogenic E. coli* (*APEC*) e utilizzano diversi fattori di virulenza, principalmente adesine e sistemi di acquisizione del ferro, per evadere i meccanismi di difesa dell'ospite e diffondere nell'organismo (Dziva e Stevens, 2008). I sierotipi più comunemente responsabili della colibacillosi nel pollame sono O1, O2, and O78 (Circella et al., 2012). Tuttavia, vari altri sierotipi possono essere coinvolti. Ad esempio, O111 è responsabile sia di forme setticemiche che di polisierositi nelle galline ovaiole (Zanella et al., 2000), mentre O128 and O139 sono associati

a forme respiratorie con aerosacculiti, pericarditi e peri-epatiti (Giovanardi et al., 2005). Il controllo della colibacillosi è stato spesso basato in passato sull'uso di antibiotici. Tuttavia, considerato l'incremento dei fenomeni di antibiotico resistenza legato all'uso frequente delle molecole, il potenziale rischio di trasmissione di batteri antibioticoresistenti all'uomo attraverso la catena alimentare o la possibile esposizione di veterinari e addetti alla produzione attraverso il contatto con animali contaminati da batteri antibiotico resistenti, l'uso degli antibiotici è stato ridotto drasticamente in un'ottica "One Health", a favore dell'incremento delle misure alternative di prevenzione e controllo. Attualmente è disponibile un vaccino vivo commerciale allestito con *E. coli* O78 registrato in UE dal 2013 e distribuito in diversi Paesi, tra cui l'Italia, la Germania, la Spagna e la Francia, che protegge nei confronti dei ceppi di campo O78 e in misura molto meno efficace nei confronti di stipiti appartenenti ad altri sierotipi (Galal et al., 2018). Altre potenziali misure di controllo possono essere i probiotici, gli acidificanti intestinali e alcuni composti naturali. Tra questi, la cannella è dotata di potenziali attività antimicrobiche, che sembrano legate principalmente all'aldeide cinnamica presente nelle diverse parti della pianta che vengono utilizzate per ottenere l'olio essenziale (Vasconcelos et al., 2018). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la potenzialità antimicrobica di questo olio essenziale nei confronti di stipiti *APEC* isolati da casi di colibacillosi.

## **MATERIALI E METODI**

### *Olio essenziale di cannella e modalità di utilizzo nelle prove di efficacia*

È stato utilizzato un prodotto commerciale (ERBA VITA GROUP S.p.A, Chiesanuova, San Marino) contenente olio essenziale puro di cannella (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) ottenuto per idrodistillazione. Le prove di efficacia sono state effettuate su Muller–Hinton agar (Oxoid), ricostituito e sterilizzato in autoclave a 121 °C for 15 min. Il terreno è stato successivamente portato a 50 °C in bagno termostato prima di aggiungere l'olio essenziale in volumi differenti secondo quanto riportato nei paragrafi successivi.

### *Stipiti batterici utilizzati e preparazione delle sospensioni batteriche*

Sono stati utilizzati 91 stipiti di *E. coli*, precedentemente isolati da casi di colibacillosi insorti in allevamenti di galline ovaiole e conservati -a 20°C presso la ceppo-teca della sezione di Patologia aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Bari. I ceppi sono scelti in base al sierogruppo di appartenenza. In particolare, sono stati utilizzati 40 stipiti O78, 33 O2, 11 O139 e 7 O128.

### *Preparazione delle sospensioni batteriche*

Prima del loro utilizzo nelle prove di efficacia, i ceppi sono stati ripassati su TSA (Tryptic Soy agar) ed incubati a 37 °C per 24 ore. Da ciascuno stipite, in soluzione fisiologica sterile, è stata preparata una sospensione batterica con densità ottica pari a 0.5 McFarland standard corrispondente a  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL. Partendo da ogni sospensione così ottenuta, procedendo con diluizioni scalari, sono state ottenute le rispettive sospensioni in carica pari a  $10^6$  CFU/mL.

### *Test preliminari di efficacia*

Sono stati effettuati utilizzando 2 ceppi di *E. coli* O2 e 2 stipiti O78, allestendo per

ognuno le rispettive sospensioni con carica  $10^8$  CFU/mL e  $10^6$  CFU/mL. Utilizzando una metodica già descritta (Circella et al., 2022), 10  $\mu$ L delle sospensioni in carica  $10^8$  CFU/mL sono stati seminati *a spot* su Muller–Hinton agar contenente l’olio essenziale in concentrazioni da 0.01 a 1% (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1%) corrispondenti da 0.1  $\mu$ L/mL a 10  $\mu$ L/mL (0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu$ L/mL), rispettivamente. Dieci  $\mu$ L delle sospensioni batteriche pari a  $10^6$  CFU/mL sono state inoculate *a spot* sul terreno contenente l’olio in concentrazioni da 0.005 to 0.5% (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%) corrispondenti da 0.05 a 5  $\mu$ L/mL (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5  $\mu$ L/mL). Ogni sospensione è stata inocolata contemporaneamente su Muller–Hinton agar privo dell’olio essenziale, come controllo positivo di crescita. Tutte le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 h in condizioni di aerobiosi. L’effetto inibitorio dell’olio essenziale è stato interpretato in base alla inibizione della crescita batterica in corrispondenza dello *spot* di semina.

### *Test di efficacia*

In base ai risultati emersi dai test preliminari, per analizzare i ceppi batterici in carica pari a  $10^8$  CFU/mL, sono state scelte le concentrazioni scalari di olio essenziale da 0.01 a 0.08% (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08%) corrispondenti da 0.1 a 0.8  $\mu$ L/mL (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8  $\mu$ L/mL).

Per analizzare i ceppi in carica pari a  $10^6$  CFU/mL, sono state scelte le concentrazioni da 0.01 to 0.05% (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05%) corrispondenti da 0.1 a 0.5  $\mu$ L/mL (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5  $\mu$ L/mL). Le sospensioni batteriche sono state seminate *a spot* sui terreni come già descritto. Per ciascun ceppo è stato inoltre adottato un controllo di crescita, come già riportato nel paragrafo precedente. Dopo incubazione dei terreni per 24 h a 37 °C in aerobiosi, sono stati letti i risultati, valutando l’efficacia dell’olio essenziale in base alla crescita o mancanza di crescita in corrispondenza dello *spot* di semina. I test sono stati eseguiti due volte in due giornate differenti, per poter confermare la ripetitività dei risultati.

## **RISULTATI**

### *Test preliminari*

I 4 ceppi analizzati nei test preliminari in carica pari a  $10^8$  CFU/mL sono stati inibiti dall’olio essenziale fino alla concentrazione di 0.5  $\mu$ L/mL. In presenza di 0.1  $\mu$ L/mL di olio essenziale, nessuno dei 4 ceppi analizzati è stato inibito. Per le prove con carica batterica di  $10^6$  CFU/mL, tutti i 4 ceppi sono stati inibiti da 5 a 0.5  $\mu$ L/mL di olio essenziale, mentre sono tutti cresciuti in presenza dell’olio in concentrazioni pari a 0.1 and 0.05  $\mu$ L/mL.

### *Test di efficacia nei confronti degli stipiti analizzati in carica batterica pari a $10^8$ CFU/mL*

Considerando il totale dei ceppi, la concentrazione di olio essenziale in grado di inibire il 90% degli stipiti testati ( $MIC_{90}$ ) è risultata pari a 0.5  $\mu$ L/mL. Il valore di  $MIC_{50}$  è invece corrisposto a 0.4  $\mu$ L/mL (tabella 1).

Non sono state osservate differenze dei valori di  $MIC_{90}$  e  $MIC_{50}$  in base al sierogruppo, ad eccezione degli stipiti O139 per i quali i valori di  $MIC_{90}$  e  $MIC_{50}$  sono risultati equivalenti e pari a 0.5  $\mu$ L/mL.

Sierogruppo	N° stipiti	Olio essenziale (µL/mL)	N° inibiti (%)	p-Value
O78	40	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	0 (0)	
		0.4	24 (60)	
		0.5	40 (100)	
		0.6	40 (100)	
		0.7	40 (100)	
		0.8	40 (100)	
O2	33	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	1 (3)	
		0.4	23 (69.7)	
		0.5	32 (97)	
		0.6	33 (100)	
		0.7	33 (100)	
		0.8	33 (100)	
O139	11	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	0 (0)	
		0.4	6 (36.4)	
		0.5	11 (100)	
		0.6	11 (100)	
		0.7	11 (100)	
		0.8	11 (100)	
O128	7	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	0 (0)	
		0.4	6 (85.71)	
		0.5	7 (100)	
		0.6	7 (100)	
		0.7	7 (100)	
		0.8	7 (100)	
Totale	91	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	1 (1.09)	
		0.4	59 (64.83)	
		0.5	90 (98.9)	
		0.6	91 (100)	
		0.7	91 (100)	
		0.8	91 (100)	

**Tabella 1.** Effetto inibitorio dell'olio essenziale di cannella nei confronti di *E. coli* appartenenti a sierogruppi diversi analizzati in carica pari a 10<sup>8</sup> CFU/mL.

*Test di efficacia nei confronti degli stipiti analizzati in carica batterica pari a  $10^6$  CFU/mL*

Per la totalità dei ceppi analizzati in carica batterica pari a  $10^6$  CFU/mL, i valori di MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>50</sub> sono risultati rispettivamente pari alle concentrazioni di 0.4 e 0.3 µL/mL di olio essenziale (tabella 2). Andando ad osservare il comportamento dei ceppi in base al sierogruppo, gli stessi valori si sono confermati per gli stipiti O2 e O78, mentre per i ceppi O128 e O139 i valori di MIC<sub>90</sub> e MIC<sub>50</sub> risultavano entrambi corrispondenti a 0.4 µL/mL.

In presenza di concentrazioni di olio essenziale pari a 0.2 µL/mL, è stata osservata l'inibizione di 9 stipiti appartenenti ai sierogruppi O2 e O78.

Sierogruppo	N° stipiti	Olio essenziale (µL/mL)	N° inibiti (%)	p-Value
O78	40	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	5 (12.5)	
		0.3	36 (90)	
		0.4	40 (100)	
		0.5	40 (100)	
O2	33	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	4 (12.1)	
		0.3	23 (69.7)	
		0.4	33 (100)	
		0.5	33 (100)	
O139	11	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	0 (0)	
		0.4	11 (100)	
		0.5	11 (100)	
O128	7	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	0 (0)	
		0.3	0 (0)	
		0.4	7 (100)	
		0.5	7 (100)	
Totale	91	0.1	0 (0)	<0.001
		0.2	9 (9.9)	
		0.3	59 (64.8)	
		0.4	91 (100)	
		0.5	91 (100)	

**Tabella 2.** Effetto inibitorio dell'olio essenziale di cannella nei confronti di *E. coli* appartenenti a sierogruppi diversi e analizzati in carica pari a  $10^6$  CFU/mL.

## DISCUSSIONE

I principali costituenti dell'olio essenziale di cannella sono rappresentati da aldeide cinnamica o cinnamaldeide, presente prevalentemente (circa 88%), alcool benzilico (8%), ed eugenolo (1%), che hanno attività sinergica (Abd El-Hack et al., 2020) e favoriscono la penetrazione della cinnamaldeide nello strato fosfolipidico delle pareti cellulari batteriche, favorendone il legame con le proteine. Ne consegue la coagulazione citoplasmatica, la denaturazione di enzimi e proteine e la perdita di metaboliti e ioni (Burt, 2004). L'efficacia dell'olio essenziale emersa in questo studio nei confronti dei ceppi testati è di particolare interesse in quanto *E. coli* è un germe Gram-negativo, ed ha quindi uno spesso strato di lipopolisaccaridi, che dovrebbe rendere il germe potenzialmente più resistente rispetto ai batteri Gram positivi (Shen et al., 2015, Zhang et al., 2016). Studi condotti sul ceppo di riferimento di *E. coli* ATCC 25922 (He et al., 2019), hanno evidenziato che la cinnamaldeide può inibire la replicazione batterica aumentando la permeabilità della membrana cellulare, causando il collasso e la perdita del contenuto cellulare, e inducendo danni ossidativi. L'esposizione all'aldeide cinnamica modifica la struttura e la morfologia cellulare, alterando la composizione degli acidi grassi e legandosi direttamente al DNA genomico, come osservato sul ceppo di riferimento ATCC 8735 di *E. coli* (He et al., 2018). Valutazioni effettuate su *E. coli* e altri batteri Gram-negativi come *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Vibrio* spp. hanno evidenziato che la cannella è in grado di interferire anche con le funzioni mitocondriali e i meccanismi di divisione cellulare (Shen et al., 2015). Inoltre, sembrerebbe in grado di ridurre l'espressione dei geni associati alla produzione dei flagelli e del biofilm (Vasconcelos et al., 2018). Tali differenti meccanismi di azione che agiscono su diversi target rendono potenzialmente molto complessa l'organizzazione di meccanismi di resistenza da parte dei batteri (Becerril et al., 2012).

L'olio essenziale ha mostrato in questa ricerca una buona efficacia antimicrobica nei confronti di stipiti patogeni di *E. coli*, con valori di MIC variabili da 0.2 a 0.4 µL/mL e 0.3 a 0.6 µL/mL a seconda dei ceppi testati e della carica batterica ( $10^6$  UFC/mL e  $10^8$  UFC/mL) con cui sono stati analizzati, similmente a quanto osservato in un precedente studio (Usha et al., 2012). Tuttavia, i quantitativi efficaci risultano variabili a seconda degli studi, tra 0.8 e 3.2 mg/mL (Prabuseenivasan et al., 2006), 1 mg/mL (Zhang et al., 2016), 2.5 mg/mL (Raesi, et al., 2015), 6.25 mg/mL (Lu et al., 2021). Tale variabilità, anche in base a quanto da noi osservato, più che legata alla carica batterica con cui i ceppi vengono testati, potrebbe dipendere dal metodo utilizzato per ottenere l'estratto dell'olio essenziale, in quanto il quantitativo di aldeide cinnamica nell'olio può dipendere dal solvente e dai parametri di pressione e temperatura utilizzati nel metodo estrattivo (Wardatun et al., 2017). Inoltre, le condizioni di laboratorio possono inficiare direttamente il principio attivo presente nell'olio, in quanto l'esposizione a temperature piuttosto elevate, il contatto prolungato con l'aria, l'esposizione alla luce possono degradare l'aldeide cinnamica e ridurre l'efficacia (Yu et al., 2020). L'olio essenziale puro usato nel nostro studio è ottenuto per idro-distillazione, processo che consente di ottenere un elevato contenuto del principio attivo, variabile dal 52% all'81% (Kazemi e Mokhtariniya, 2016).

L'efficacia dell'olio è risultata molto valida, senza sostanziali differenze in base al sierogruppo di appartenenza dei ceppi, anche in caso di cariche batteriche elevate equiparabili a quelle riscontrate in caso di colibacillosi conclamata. Questo risultato

aprirebbe alla possibilità di utilizzare la sostanza naturale, oltre che con finalità preventive, anche in caso di necessità terapeutiche, associandola alle molecole antibiotiche, potendone potenziare la loro efficacia e ridurre i relativi dosaggi (El Atki et al., 2019). Ad esempio, l'olio essenziale di cannella agisce in sinergismo con l'ampicillina e il cloramfenicolo nei confronti di *Staphylococcus aureus*, e con il cloramfenicolo nei confronti di *E. coli*, riducendo i valori di MIC degli antibiotici (El Atki et al., 2019). Analogamente, la cannella potenzia l'efficacia della piperacillina nei confron

ti di *E. coli* (Yap et al., 2013), e della colistina nei confronti di ceppi multi-resistenti di *Pseudomonas aeruginosa* (Utchariyakiat et al., 2016).

Inoltre, utilizzato come additivo nel mangime di broilers, l'olio essenziale di cannella ha comportato un incremento dei villi della mucosa intestinale ed un miglioramento delle difese immunitarie locali (Kettunen et al., 2006; Jang et al., 2007), contribuendo a proteggere gli animali dalle infezioni intestinali.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio condotto *in vitro* evidenziano l'efficacia dell'olio essenziale di cannella nell'inibire stipiti di APEC appartenenti a sierogruppi frequentemente coinvolti nei casi di colibacillosi e analizzati anche in cariche elevate, corrispondenti a quelle presenti nei tessuti in caso di malattia conclamata. Pertanto, considerato che la colibacillosi costituisce una delle patologie più frequenti negli allevamenti avicoli e, allo stesso tempo, rappresenta un problema rilevante, l'olio essenziale mostra la potenzialità per un suo utilizzo nella prevenzione, specialmente se associato alle misure di biosicurezza e altri metodi preventivi, ma anche nel controllo della malattia, associato al trattamento antibiotico per potenziarne l'efficacia. Ulteriori studi sono necessari per stabilire le modalità di somministrazione e i dosaggi più idonei per un eventuale utilizzo in campo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nolan L.K., Vaillancourt J.P., Barbieri N.L., Logue C.M. (2020). Colibacillosis. *Diseases of Poultry*, 14th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA. pp. 770–830.
2. La Ragione R., Woodward M. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73: 27–35.
3. Schouler C., Schaeffer B., Bree A., Mora A., Dahbi G., Biet F., Oswald E., Mainil J., Blanco J., Moulin-Schouleur M. (2012). Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1673–1678.
4. Dziva F., Stevens M.P. (2008). Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37: 355–366.
5. Circella E., Pennelli D., Tagliabue S. Camarda A. (2012). Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* from laying hens in Apulia, southern Italy. *Br. Poult. Sci.* 53: 465–470.
6. Zanella A., Alborali G.L., Bardotti M., Candotti P., Guadagnini P.F., Anna Martino P., Stonfer M. (2000). Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathol.* 29: 311–317.

7. Giovanardi D., Campagnari E., Ruffoni Sperati L., Pesente, P., Ortali G., Furlattini V. (2005). Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathol.* 34: 313–318.
8. Galal H.M., Tawfek A.M., Abdrabou M.I., Hessain A.M., Alhaaji J.H., Kabli S.A., Elbehiry A., Alwarhi W.K., Moussa I.M. (2018). Recent approaches for control of *E. coli* and respiratory complex in Middle East. *Saudi J. Biol. Sci.* 25: 1302–1307.
9. Vasconcelos N.G., Croda J., Simionatto S. (2018). Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb. Pathog.* 120: 198–203.
10. Circella E., Casalino G., D’Amico F., Pugliese N. Dimuccio M.M., Camarda A Bozzo G. (2022). In vitro antimicrobial effectiveness tests using Garlic (*Allium sativum*) against *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis. *Antibiotics.* 11: 1481.
11. Abd El-Hack M.E., Alagawany M., Abdel-Moneim A.M., Mohammed N.G., Khafaga A.F., Bin-Jumah M., Othman S.I., Allam A.A., Elnesr S.S. (2020). Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oil as a potential alternative to antibiotics in poultry. *Antibiotics.* 9: 210.
12. Burt S. (2004). *Essential oils*: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.
13. Shen S., Zhang T., Yuan Y., Lin S., Xu J., Ye H. (2015). Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control.* 47: 196–202.
14. Zhang Y., Liu X., Wang Y., Jiang P., Quek S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control.* 59: 282–289.
15. He T.F., Wang L.H., Niu D.B., Wen Q.H., Zeng X.A. (2019). Cinnamaldehyde inhibit *Escherichia coli* associated with membrane disruption and oxidative damage. *Arch. Microbiol.* 201: 451–458.
16. He T.F., Zhang Z.H., Zeng X.A., Wang L.H., Brennan C.S. (2018). Determination of membrane disruption and genomic DNA binding of cinnamaldehyde to *Escherichia coli* by use of microbiological and spectroscopic techniques. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 178: 623–630.
17. Becerril R., Nerín C., Gómez-Lus R. (2012). Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog. Dis.* 9: 699–705.
18. Usha M., Ragini S., Naqvi S.M. (2012). Antibacterial activity of acetone and ethanol extracts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and Ajowan (*Trachyspermum ammi*) on four food spoilage bacteria. *I. Res. J. Biological Sci.* 1: 7–11.
19. Prabuseenivasan S., Javakumar M., Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 6: 39.
20. Raeisi M., Tajik H., Yarahmadi A., Sanginabadi S. (2015). Antimicrobial Effect of Cinnamon Essential Oil Against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. *Health Scope.* 4: 1–5.
21. Lu C., Liu H., Shangguan W., Chen S., Zhong Q. (2021). Antibiofilm activities of the cinnamon extract against *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 203: 125–135.

22. Wardatun S., Rustiani E., Alfiani N., Rissani D. (2017). Study effect type of extraction method and type of solvent to cinnamaldehyde and trans-cinnamic acid dry extract cinnamon (*Cinnamomum burmanii* [Nees & T, Nees] Blume). *J. Young Pharm.* 9: 49–51.
23. Yu C., Li Y.L., Liang M., Dai S.Y., Ma L., Li W.G., Lai F. Liu X.M. (2020). Characteristics and hazards of the cinnamaldehyde oxidation process. *RSC Adv.* 10: 19124–19133.
24. Kazemi M., Mokhtariya S. (2016). Essential oil composition of bark of *Cinnamomum zeylanicum*. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 19: 786–789.
25. El Atki Y., Aouam I., El Kamari F., Taroq A., Nayme K., Timinouni M., Lyoussi B., Abdellaoui A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 10: 63–67.
26. Yap P.S., Lim S.H., Hu C.P., Yiap B.C. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine.* 20: 710–713.
27. Utcharyakiat I., Surassmo S., Jaturanpinyo M., Khuntayaporn P., Chomnawang M.T. (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement. Altern. Med.* 16: 158.
28. Kettunen H., Ouwehand A., Schulze H., Rautonen N. (2006). Dietary essential oil supplementation enhanced intestinal immunocompetence in young broiler chick. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: S101.
29. Jang I.S., Ko Y.H., Kang S.Y., Lee C.Y. (2007). Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134: 304–315.

# ATTIVITÀ ANTICOCCIDICA IN VITRO E IN VIVO DI PRINCIPI ATTIVI VEGETALI NEI CONFRONTI DI *EIMERIA SPP.*

Carlu C.<sup>1</sup>, Chabrilat T.<sup>1</sup>, Del Zozzo F.<sup>2</sup>, Girard C.<sup>1</sup>, Kerros S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Phytosynthese, 57 Av. Jean Jaurès, 63200 Mozac, Francia;*

<sup>2</sup> *Chemifarma S.p.A., Via Don Eugenio Servadei, 16, 47122 Forlì, FC, Italia*

## Summary

This study assessed the anticoccidial activity of different botanical compounds against *E. tenella* and their effect on feed utilisation and histological analysis through *in vitro* and *in vivo* trials. 4 different families of botanicals were selected to perform this study (Urticaceae, Acanthaceae, Lilaceae and Lamiaceae extract). Colorimetric test was used to calculate the number of viable parasites after a time of incubation. 3 plants extracts showed a reduction of *E. tenella* sporozoite viability when only the 2 extracts rich in non-volatile molecules expressed a reduction of sporulation. Lamiaceae (Essential oil) did not show viability or sporulation effect against *E. tenella*. Considering the *in vivo* challenge performed on broilers, 3 types of *Eimeria* were inoculated (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*) on 3 experimental groups and 1 control group. Results showed that all these 4 botanicals reduced lesion scoring (lesion score <1 vs. 2.64 and 3 for control groups) and feed conversion ratio by -8%; -8%; -6%; -11% for PE1, PE2, PE3, PE4, respectively. This study revealed the anticoccidial activity of different families of botanical compounds with reduction of sporozoite viability by some and modes of action for other such as Lamiaceae as shown by *in vivo* data.

## INTRODUZIONE

La coccidiosi rappresenta indubbiamente una delle principali preoccupazioni per l'allevamento avicolo.

La coccidiosi aviaria è causata da numerose specie di protozoi appartenenti al genere *Eimeria* che sono responsabili di gravi danni a carico degli enterociti con il conseguente instaurarsi di infiammazione, riduzione delle performance e notevoli perdite economiche (Felici et al., 2020). Nella produzione avicola, questa patologia ha un costo di circa 3 miliardi di dollari per anno riguardanti i costi per i trattamenti medicati, per le perdite di performance e per l'aumento di mortalità. (Cobaxin-Cardenas, 2016). Tra le specie di *Eimeria* causa di patologia, *E. tenella* ed *E. maxima*, sono sicuramente tra quelle più dannose per elevata mortalità e gravità dei segni clinici, mentre *E. acervulina* è soprattutto responsabile di forme subcliniche (Felici et al., 2020). Inoltre, la coccidiosi è di solito considerata come il risultato di una coesistenza di diverse specie di *Eimeria* spp., dato che ciascuna ha caratteristiche proprie nel generare lesioni intestinali sia per posizione che per estensione (Quiroz-Castañeda and Dantan-Gonzalez, 2015).

L'utilizzo di coccidiostatici a scopo preventivo insieme all'utilizzo di trattamenti farmacologici specifici è comunemente presente da tempo nel settore avicolo, per tenere sotto controllo questa patologia (Sidiropoulou et al., 2020). Tuttavia, l'instaurarsi di coccidiostatico-resistenza e il calo della sensibilità di questi microorganismi verso alcuni trattamenti rappresentano una vera e propria criticità. Quindi, la riduzione dell'utilizzo di trattamenti e la ricerca di alternative naturali sono sempre di più considerate una soluzione per aumentare la redditività e nello stesso tempo per garantire un migliore stato

sanitario.

Molti principi attivi di origine vegetale, metaboliti secondari prodotti da diverse specie botaniche, stanno riscuotendo un crescente interesse per la loro efficacia per la prevenzione della coccidiosi (El-Shall et al., 2022). Per via della loro complessità ed eterogeneità, i relativi meccanismi d'azione sono diversi e a volte non del tutto chiari. Negli ultimi decenni estratti ed oli essenziali di varie piante aromatiche sono stati indagati come possibili sostituti di anti coccidici chimici convenzionali (Yang et al., 2019; Felici et al., 2020; Băieș et al., 2022). Questi composti vengono ottenuti da piante aromatiche specifiche per estrazione e possono, a loro volta, contenere principi attivi volatili e non volatili, nonostante i risultati siano promettenti e in alcuni casi di fatto efficaci, molte altre molecole non sono ancora state testate sia in vitro che in vivo in presenza di infestazioni con varie specie di *Eimeria* simultaneamente presenti (Juin et al., 2007).

L'obiettivo di questo studio è quello di mettere a confronto l'efficacia di due estratti vegetali specifici con 2 oli essenziali comunemente utilizzati per ridurre l'incidenza della coccidiosi. Verrà quindi affrontato, da un lato la valutazione dell'efficacia in vitro di molecole di origine vegetale, volatili e non volatili, nei confronti di *E. tenella*, e dall'altro, la valutazione dell'efficacia in vivo contro l'infestazione di 3 specie diverse di *Eimeria*.

## **MATERIALI E METODI**

### *Origine degli estratti vegetali testati*

In questo studio sono stati utilizzati 4 estratti botanici forniti dall'azienda Phytosynthese in accordo con le relative specifiche del controllo qualità. Questi 4 principi attivi sono stati selezionati da differenti famiglie botaniche in base alle proprietà specifiche evidenziate in letteratura e in base alla loro conformità ai regolamenti UE concernenti la qualità e le autorizzazioni di utilizzo.

2 estratti da piante cosiddette “medicinali”, descritti come molecole attive non volatili: Estratto di Urticaceae (PE1) ricco in scopoletina, una cumarina presente in molte specie vegetali, con effetti antimicrobici ed antifungini (Gnonlonfin et al. 2012)

Estratto di Acanthaceae (PE2) ricco in lattoni ditirpenici (Tran The Hong Hanh et al., 2020)

2 oli essenziali (molecole volatili):

Liliaceae (*Allium sativum*) Olio essenziale (PE3)

Lamiaceae (*Origanum vulgare*) Olio essenziale (PE4).

### *Attività in vitro di E. tenella*

In questo studio l'attività anticoccidica di differenti estratti botanici è stata testata nei confronti di un ceppo *E. tenella* sia per l'attività antiparassitaria diretta (vitalità) nei confronti degli sporozoi sia sull'inibizione della sporulazione delle oocisti sempre sullo stesso ceppo.

### *Valutazione di Citotossicità*

Per realizzare questo studio, sono stati utilizzati dei broiler di un centro sperimentale INRAE (Nouzilly center) per evitare contaminazioni ambientali con altri ceppi. I broiler sono stati infestati con oocisti sporulate. Le oocisti non sporulate sono state raccolte da campioni ciecali (Henken et al., 1994).

Per prima cosa, la citotossicità dei campioni è stata valutata utilizzando l'MTS test su

linea cellulare Madin-Darby bovine Kidney (MDBK), secondo il metodo descritto da Silpa (2015). La diluizione più bassa di ciascun estratto senza effetti di citotossicità (dose letale 10% utilizzando MTS test su cellule MDBK) è stata utilizzata per la valutazione di vitalità, invasività e sporulazione.

#### *Infestazione sperimentale*

Per il test di vitalità degli sporozoi è stata utilizzata la colorazione con Evans blue (incubazione 41°C per 1 ora), con 3 ripetizioni. Dopo il periodo di incubazione, i coccidi sono stati osservati al microscopio per la conta dei parassiti vivi e morti. Il test di inibizione dell'invasività è stato eseguito utilizzando una piastra a 96 pozzetti:  $1,5 \times 10^2$  cellule MDBK infestate con sporozoite (Multiplicity of infection, MOI=1), sono state incubate con ciascun campione (4 ripetizioni) a 41°C. I ceppi di *E. tenella* possono essere quantificati in base ad una attività enzimatica specifica che può essere quantificata dopo 2 ore di incubazione a 37°C. Il grado di invasività è stato definito come la percentuale di oocisti sporulate nei campioni testate in comparazione con le oocisti sporulate nei campioni di controllo. Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare ogni percentuale di sporulazione con il controllo,  $p < 0,05$  è stato considerato come livello significativo.

#### *Animali e disegno sperimentale*

Il test in vivo consisteva in due infestazioni sperimentali consecutive. Pulcini maschi di broiler Ross 308 sono stati allevati in gabbia per 27 giorni, da 8 a 35 giorni. È stato somministrato un solo tipo di mangime formulato con il 22% di proteina grezza e costituito da farina di frumento, mais e soia. Ciascun test prevedeva 2 replicazioni di 8 soggetti ciascuno di cui 1 controllo negativo e 4 gruppi sperimentali. A ciascun gruppo sperimentale è stato somministrato un estratto di piante nel mangime con la seguente identificazione: PE1, PE2, PE3, PE4.

1 ml di inoculum (*E. tenella* 200 000 oocisti; *E. acervulina* 10 000 oocisti; *E. maxima* 10 000 oocisti) è stato somministrato per os individualmente, il giorno 14.

Gli estratti di piante sono stati miscelati con la farina di frumento per poi essere aggiunti al mangime al dosaggio di 1kg/T di mangime. I 4 estratti sono stati testati in modo da avere la stessa concentrazione finale di 40 ppm nel mangime.

#### *Campionamento*

Le oocisti per grammo di feci (OPG) sono state contate individualmente secondo il protocollo Mc Master al giorno 13 (1 giorno prima dell'inoculazione) e il giorno 26 (12 giorni dopo l'inoculazione) come descritto da Long et al. (1976). 6 soggetti di ciascun gruppo sono stati sacrificati al giorno 26 per la valutazione dello score intestinale secondo lo schema di Johnson and Reid. Le indicazioni di score sono le seguenti: nessuna lesione (score 0); lesione lieve (score 1); lesione moderata (score 2); lesione grave (score 3) lesioni estremamente gravi (score 4) (Johnson & Reid, 1970).

Il consumo di mangime e il peso vivo sono stati misurati per gabbia al giorno 8 e al giorno 35 per calcolare l'indice di conversione (FCR) della prova sperimentale.

## **RISULTATI**

I due estratti non volatili PE1 e PE2 sono stati meno citotossici sulla linea cellulare MDBK rispetto ai 2 oli essenziali (PE3 e PE4). Infatti il 10% della dose letale ottenuta

per il test in vitro con *E. tenella* è stato di  $10^{-2}$  per PE1 e PE2 e di  $10^{-4}$  per PE3 e PE4. Piante appartenenti alle famiglie delle Urticaceae (PE1), Achantaceae (PE2), Liliaceae (PE3) sono in grado di ridurre in modo significativo la vitalità dei parassiti del 31%, 73% e 19% ( $p < 0,05$ ) rispettivamente in condizioni acellulari (Figura 1). Non è stato riscontrato nessun effetto significativo sull'invasione della linea cellulare MDBK, alle concentrazioni testate. Solo PE1 ha inibito in modo significativo la sporulazione delle oocisti del 26% ( $p < 0,05$ ); nessun effetto sulla sporulazione è stato osservato con PE2, PE3 e PE4 (Figura 2).

A D13, prima dell'infestazione, i polli non avevano nessuna escrezione di oocisti. A D26 OPG è calato in modo significativo in tutti i gruppi sperimentali in comparazione al gruppo controllo (Figura 5). I gruppi controllo hanno avuto rispettivamente 26500 e 48500 OPG, mentre i gruppi trattati hanno avuto una riduzione significativa ( $p < 0,001$ ) di OPG tra 100 e 8000. Non è stata trovata nessuna differenza significativa tra i gruppi trattati. Rispetto al gruppo controllo, l'olio essenziale di Liliaceae ha ridotto del 97% il numero di OPG e quello di Lamiaceae del 93%. Le molecole non volatili hanno portato ad una riduzione dell'81% e dell'88% di OPG al giorno 26.

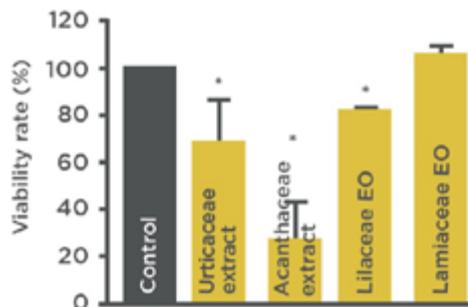
I test in vivo hanno dimostrato che tutti e 4 gli estratti di piante sono in grado di ridurre il lesion score. In questo studio gli score riportati sono di  $< 1$  vs 2,64 e 3 nei gruppi controllo al D26. Non è stata trovata differenza statistica per via del numero limitato di soggetti sacrificati (Figura 3).

FCR è migliorato per i gruppi trattati con 1,849, 1,741, 1,739, 1,744 rispettivamente per PE1, PE2, PE3, PE4 vs. 1,884 e 1,969 per il gruppo controllo alla prima e seconda ripetizione (Figura 4).

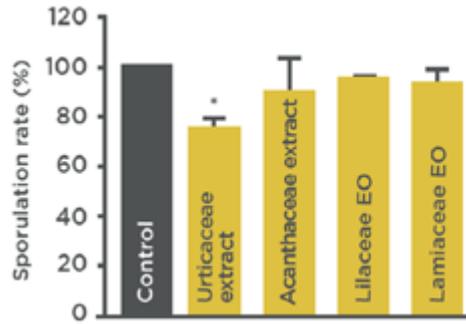
## DISCUSSIONE

La coccidiosi è una patologia parassitaria trasmessa con le oocisti presenti nella lettiera dei polli. Per questo motivo, la ricerca di sostanze ad effetto anticoccidico che non abbiano residui potenzialmente pericolosi, sarebbe di grande utilità per il settore avicolo e per i consumatori. Gli screening realizzati in vitro hanno permesso di valutare la citotossicità di differenti molecole di origine vegetale, contro gli sporozoi di *E. tenella*. Due oli essenziali ricchi in molecole volatili e 2 estratti di piante ricchi in molecole non volatili, sono stati testati. Le molecole non volatili dalla famiglia di Urticaceae (PE1) e da Acanthaceae (PE2) hanno avuto il miglior risultato sulla vitalità. Le molecole non volatili, in particolar modo, gli estratti di Urticaceae, si sono dimostrate efficaci nel limitare il grado di sporulazione. Questi ultimi sembrano avere il maggior impatto sullo sviluppo dei protozoi, sia per la vitalità che per la sporulazione. Tuttavia, la concentrazione di PE1 e PE2 è stata più alta rispetto a PE3 e PE4 per via della citotossicità sulla linea cellulare MDBK. Alcuni studi hanno dimostrato i meccanismi d'azione protettivi di component bioattivi che esercitano un effetto diretto sul parassita stesso, alterando così il suo ciclo vitale nell'ospite (Youn & Noh, 2001; Applegate, 2009; Peek & Landman (2011) hanno indicato azioni di diverso tipo esercitate da estratti di piante sull'incidenza di coccidiosi. Questi ultimi infatti possono agire direttamente su *Eimeria*, ma anche sul microbiota o sul sistema immunitario intestinale. Inoltre, altri autori hanno evidenziato altri meccanismi d'azione come l'effetto antiossidante, antinfiammatorio e contro lo stress ossidativo. Altri meccanismi d'azione rimangono ad oggi poco chiari (Abbas et al. 2012). I risultati ottenuti con PE4, positivi in vivo ma negativi in vitro, possono essere giustificati con il possibile effetto benefico sulla microflora (Bauer et al. 2020)

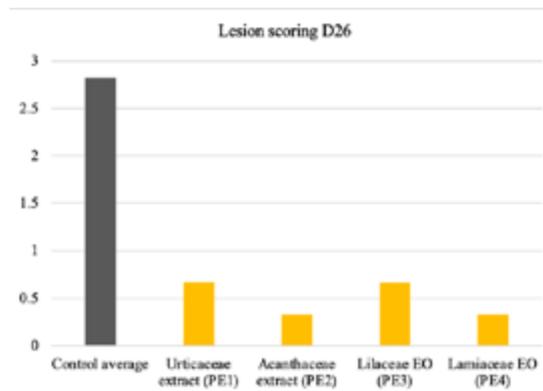
Nel test di campo, non è stato dimostrato nessun effetto sulla vitalità, l'invasività e la sporulazione con EO di Lamiaceae, ma sono stati riscontrati risultati interessanti nei test in vivo riguardanti l'ICA nel periodo tra 8 e 35 giorni. Tuttavia, Abbas et al. (2012) hanno dimostrato che le piante della Famiglia delle Lamiaceae (timo, origano) sono in grado di interferire con alcuni stadi del ciclo riproduttivo dei coccidi, come la distruzione di sporozoi ed oocisti. Altri autori, in studi in vitro, hanno concluso che molti EO hanno la capacità di distruggere le oocisti di *Eimeria* (Remma et al., 2011). Sidiropoulou et al. (2020) hanno dimostrato che la stessa concentrazione di olio essenziale di origano era stata in grado di ridurre l'invasione dopo 2 ore, mentre l'olio di aglio non è stato in grado; tuttavia, entrambi sono stati efficaci dopo 24 ore. Il tempo di contatto utilizzato di un ora, utilizzato nel nostro esperimento, non è stato sufficientemente lungo per poter essere comparato con questi risultati. Gli oli essenziali sono un'importante risorsa di prodotti ricchi in fitocomplessi. Studi sia in vitro che in vivo hanno dimostrato che gli oli essenziali sono utili nel controllo della coccidiosi. (Muthamilselvan et al., 2016) L'indice di conversione è migliorato in tutti i gruppi sperimentali in comparazione con i gruppi controllo. ICA si è ridotto dell'8% sia per entrambe le molecole non volatili sia gli oli essenziali, l'indice di conversione è migliorato del 6% e dell'11% per PE3 e PE4 rispettivamente. Gli oli essenziali di Lamiaceae hanno dimostrato un risultato positive sulle performance zootecniche senza un'azione diretta sui microrganismi in vitro. Lamiacea EO potrebbero avere un impatto positivo sul controllo del microbiota batterico che può contribuire a limitare lo sviluppo di coccidi. In uno studio, Sidiropoulou et al. (2020) hanno dimostrato un miglioramento delle performance e dell'escrezione di oocisti con la somministrazione di origano ed aglio (50 ppm di origano e 5 ppm di aglio). Hanno evidenziato una differenza nella diversità del microbioma del digiuno e dei ciechi che potrebbe essere maggiormente benefica per i polli che hanno ricevuto un'alimentazione integrate con oli essenziali, rispetto al gruppo controllo. Altri studi avevano già dimostrato l'effetto positivo della somministrazione di aglio in broiler infestati sperimentalmente con coccidi, sul miglioramento delle performances, riduzione della gravità dei sintomi clinici, escrezione di oocisti e lesion score intestinali (Adjei-Mensah & Atuahene, 2023). Un altro studio aveva concluso che la somministrazione di olio essenziale di origano, era in grado di ridurre le conseguenze di un'infestazione sperimentale ed avere degli effetti positivi sull'incremento ponderale, l'indice di conversione e l'utilizzo di nutrienti (Mohiti-Asli et al., 2015).



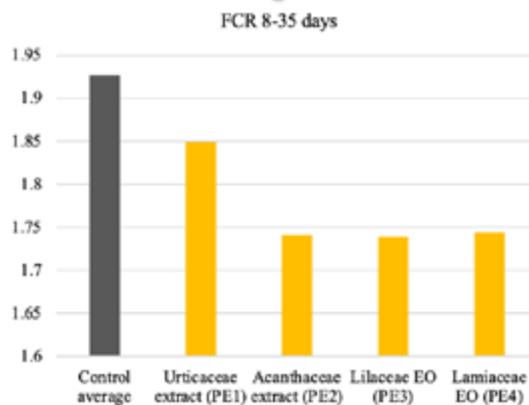
**Figura 1.** Inibizione della vitalità di sporozoi di *E. tenella* (\*:  $p < 0.05$ ) – concentrazione del 10% della dose letale su cellule MDKB.



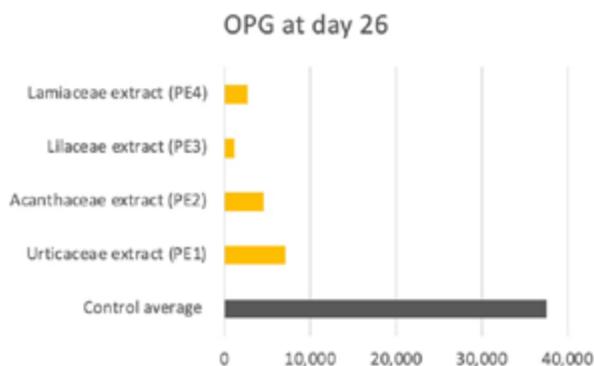
**Figura 2.** Inibizione della sporulazione di oocisti di *Eimeria tenella* (\*:  $p < 0.05$ ) – concentrazione del 10% della dose letale su cellule MDKB.



**Figura 3.** Lesion score medio 12 giorni dopo il challenge.



**Figura 4.** Indice di conversione del mangime (FCR) durante il periodo di challenge con *Eimeria* (% del controllo).



**Figura 5.** Oocisti per g di feci al giorno 26 di ciascun trattamento.

## CONCLUSIONI

Composti di origine vegetale potrebbero rappresentare una soluzione naturale, alternativa ad antibiotici ed antiparassitari, per la nutrizione di broiler, soprattutto in un contesto come l'attuale, dove la disponibilità di molecole efficaci contro i coccidi è limitata. Questo studio ha evidenziato il potenziale di alcuni composti di origine vegetale derivati da oli essenziali ed estratti di piante come alternative ai coccidiostatici, per l'allevamento industriale di broiler. Innanzitutto, la riduzione di vitalità e sporulazione di *E. tenella* da parte di differenti famiglie botaniche è stata dimostrata, in modo preliminare, in vitro. Inoltre, il miglioramento delle performances nutrizionali è stato dimostrato in prove in vivo con animali sottoposti a challenge, per tutte le categorie botaniche testate. Composti botanici derivati da Lamiaceae hanno dimostrato effetti positivi su lesion score intestinale e sull'indice di conversione, in soggetti sottoposti a challenge; questo potrebbe evidenziare un altro meccanismo d'azione, diverso da quello diretto nei confronti dei coccidi che non è stato confermato nei nostri test in vitro. Gli estratti non volatili, meno studiati, rappresentano una soluzione promettente, dati i risultati ottenuti in vivo e in vitro. Tutti e 4 i composti vegetali testati in questo studio, hanno dimostrato la loro capacità di diminuire l'intensità delle lesioni su soggetti infestati sperimentalmente con ceppi patogeni di *Eimeria* spp. Riguardo questi risultati, sono richiesti ulteriori studi per capire meglio il meccanismo d'azione di questi composti e il costo/beneficio sull'utilizzo singolo o combinato.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abbas RZ, Colwell DD, Gilleard J. Botanicals: an alternative approach for the control of avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*. 2012;68:203–215.
2. Adjei MB, Atuahene CC, Attoh-Kotoku V. Effects of dietary allicin on health and blood profile of broiler chickens. *J Anim Sci Advan*. 2015;pp. 1287-1294.
3. Applegate TD. Influence of phytochemicals on the immunity of livestock and poultry. In: Steiner T, editor. *Phytochemicals in Animal Nutrition. Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance*. Nottingham: Nottingham University Press; 2009. pp. 39–59.

4. Băieș M-H, Györke A, Cotuțiu V-D, et al. The In vitro Anticoccidial Activity of Some Herbal Extracts against *Eimeria* spp. Oocysts Isolated from Piglets. *Pathogens*. 2023;12:258.
5. Bauer B, Radovanovic A, Willson N, Bajagai YS, The Thu Hao Van, Moore R, Stanley D. Oregano: A potential prophylactic treatment for the intestinal microbiota. *Heliyon*. 2019;5(10).
6. Cobaxin-Cárdenas ME. Natural compounds as an alternative to control farm diseases: avian coccidiosis. In: Quiroz-Castañeda RE, editor. *Farm Animals Disease. Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment*. London: IntechOpen; 2018. pp. 135–149.
7. Felici M, Tugnoli B, Ghiselli F, et al. In vitro anticoccidial activity of thymol, carvacrol, and saponins. *Poultry Science*. 2020;99(11):5350-5355.
8. Gnonlonfin GB, Sanni A, Brimer L. Scopoletin—a coumarin phytoalexin with medicinal properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):47-56.
9. Henken AM, Ploeger HW, Graat EAM, Carpenter TE. Description of a simulation model for the population dynamics of *Eimeria acervulina* infection in broilers. *Parasitology*. 1994;108:503–512.
10. Juin H, Naciri M, Vila B, et al. Effets de l'utilisation d'actifs végétaux naturels protégés sur les performances de croissance de poulets Ross infectés ou non par des coccidies. *Septièmes Journées de la Recherche Avicole. Tours*. 2007:344-347.
11. Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exper Parasitol*. 1970;28:30-36.
12. Long P, Millard B, Joyner L, Norton C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat*. 1976;6:201–217.
13. Mohiti-Asli M, Ghanaatparast-Rashti M. Dietary oregano essential oil alleviates experimentally induced coccidiosis in broilers. *Prev Vet Med*. 2015;120:195–202.
14. Muthamilselvan T, Kuo TF, Wu YC, Yang WC. Herbal Remedies for Coccidiosis Control: A Review of Plants, Compounds, and Anticoccidial Actions. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016:2657981.
15. Peek HW, Landman WJM. Coccidiosis in Poultry: Anticoccidial Products, Vaccines and Other Prevention Strategies. *Vet Q*. 2011;31:143-161.
16. Quiroz-Castañeda RE, Dantán-González E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *Biomed Res Int*. 2015:430610.
17. Remmal A, Chahbar SA, Ouddine LB, Chami N, Chami F. In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet Parasitol*. 2011;182:121–126.
18. Sidiropoulou E, Skoufos I, Marugan-Hernandez V, et al. In vitro Anticoccidial Study of Oregano and Garlic Essential Oils and Effects on Growth Performance, Fecal Oocyst Output, and Intestinal Microbiota in vivo. *Front Vet Sci*. 2020;7:420.
19. Silpa L, Niepceeron A, Laurent F, et al. Synthesis and evaluation of the anticoccidial activity of trifluoropyridol[1,2-a] pyrimidin-2-one derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015.
20. Yang WC, Yang CY, Liang YC. Anti-coccidial properties and mechanisms of an edible herb, *Bidens pilosa*, and its active compounds for coccidiosis. *Sci Rep*. 2019;9:2896.
21. Youn HJ, Noh JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol*. 2001;96:257–263.

# UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI COMPOSTI BOTANICI MIGLIORA LE PERFORMANCE PRODUTTIVE E LA SALUTE INTESTINALE DI POLLI DA CARNE VACCINATI PER COCCIDIOSI

Giovagnoni G.<sup>1</sup>, Tugnoli B.<sup>1</sup>, Piva A.<sup>1</sup>, Khattak F.<sup>2</sup>, Grilli E.<sup>3,4</sup>

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

<sup>2</sup> Scotland's Rural College, Edinburgh, UK;

<sup>3</sup> Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italy;

<sup>4</sup> Vetagro, Inc., 17 E. Monroe St., Suite #179, 60604 Chicago (IL), USA.

## Summary

Vaccination represents an increasingly used tool in order to control coccidiosis caused by *Eimeria*, especially due to the establishment of a proper immune response and the concern given by the recorded multi-resistances to numerous traditional anticoccidials. In the present study, a microencapsulated blend of botanicals (AviPower<sup>®</sup>2-500 manufactured by Vetagro SpA) was evaluated for its compatibility with the use of vaccination for coccidiosis. A total of 480 day-old Ross 308 male chicks were vaccinated at hatch with a live attenuated vaccine containing eight *Eimeria* spp. strains and either supplemented or not with AviPower<sup>®</sup>2-500 at 300 g/ton for 42 days (20 pens/group with 12 birds/pen). Growth performance parameters were recorded and, at day 21, 1 bird/pen was examined for potential intestinal lesions given by coccidiosis. Overall, feed conversion was improved by 5 points and the final body weight was 110 grams higher for the treated animals compared to control. No relevant intestinal lesions were recorded, but the incidence of mild ones was numerically lower for birds treated with AviPower<sup>®</sup>2-500. In conclusion, the microencapsulated blend showed a positive effect in supporting growth of vaccinated broilers, highlighting the compatibility of this product with vaccination.

## INTRODUZIONE

La coccidiosi è una patologia causata da *Eimeria* spp. con un forte impatto economico sulla produzione avicola mondiale. Si stima che i costi sostenuti per fronteggiare questa malattia siano di circa 0.19€ per ogni animale prodotto a livello globale (Blake et al., 2020). In seguito allo sviluppo di numerose resistenze verso i tradizionali anticoccidici utilizzati ad uso preventivo e terapeutico, la vaccinazione è sempre più utilizzata come profilassi contro la coccidiosi (Zaheer et al., 2022). Alcuni dei vaccini più comuni sono costituiti da oocisti vive ed attenuate di diverse specie di *Eimeria*: questa tecnologia permette agli animali di sviluppare immunità per fronteggiare successive infezioni senza l'utilizzo di farmaci in alcuni casi poco efficaci o che hanno necessità di un tempo di sospensione. Talvolta, nelle prime fasi successive alla vaccinazione, sono però riportati cali di performance, probabilmente guidati dalla replicazione delle oocisti vaccinali che causano una lieve coccidiosi subclinica (Das et al., 2021). L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione della compatibilità di AviPower<sup>®</sup>2-500 (Vetagro SpA) con la vaccinazione per coccidiosi.

AviPower<sup>®</sup>2-500 è una miscela microincapsulata di composti botanici con proprietà anticoccidiche, il cui beneficio principale durante un challenge con *Eimeria* è la mitigazione degli effetti negativi causati dai coccidi: AviPower<sup>®</sup>2-500 permette di evitare la perdita di performance legata all'infezione, riducendo allo stesso tempo le lesioni intestinali e l'escrezione di oocisti (Tugnoli et al., 2021; Tugnoli et al., 2022).

## MATERIALI E METODI

Un totale di 480 polli da carne maschi (Ross 308) sono stati vaccinati per coccidiosi alla schiusa con un vaccino vivo attenuato contenente otto ceppi di *Eimeria* spp., allocati in box (12 animali/box) ed assegnati a 2 gruppi sperimentali (20 box/gruppo):

- 1) Gruppo CTR, alimentato con una dieta standard;
- 2) Gruppo TRT, alimentato con una dieta standard supplementata con AviPower<sup>®</sup>2-500 a 300 g/ton;

Le diete, non medicate e formulate per soddisfare i fabbisogni nutrizionali Ross 308, sono state fornite *ad libitum* come pellet sbriciolato (fase starter, giorno 0-14) o come pellet (fase grower, giorno 14-28, e fase finisher, giorno 28-42). Gli animali assegnati al gruppo TRT hanno ricevuto per tutta la durata della prova AviPower<sup>®</sup>2-500, una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti prodotte da Vetagro S.p.A. ad azione anticoccidica.

La durata dello studio è stata di 42 giorni ed i box sono stati monitorati quotidianamente per controllare la mortalità. Per determinare le performance di crescita, l'ingestione media giornaliera ed i pesi medi sono stati registrati al giorno 0, 14, 28, e 42. Sono stati quindi calcolati l'incremento ponderale giornaliero e l'indice di conversione corretto per la mortalità (ICA). Al giorno 21, 1 animale/box (20 animali/gruppo) è stato sacrificato ed esaminato per effettuare lo scoring di eventuali lesioni da coccidiosi presenti.

I dati sono stati analizzati con T test (Graph Pad Prism 10; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Le differenze sono state considerate significative per  $P \leq 0.05$  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, il gruppo supplementato con AviPower<sup>®</sup>2-500 ha mostrato un miglioramento dell'ICA (-10 punti;  $P=0.04$ ), guidato da un ridotto consumo di mangime rispetto al gruppo di controllo ( $P=0.003$ ). Il miglioramento statisticamente significativo degli stessi parametri è stato riconfermato nella fase grower (giorno 14-28), con una riduzione dell'ICA di 9 punti nel gruppo TRT. Infine, gli animali trattati hanno mostrato un peso vivo finale medio più alto (+110g;  $P=0.001$ ). Analizzando la durata totale dello studio, l'ICA del gruppo TRT è stato ridotto rispetto al gruppo CTR di 5 punti ( $P=0.03$ ) ed è stata osservata una tendenza statistica nella diminuzione dell'ingestione media giornaliera. La mortalità è stata paragonabile tra i due gruppi di animali (3.3%).

	Gruppo CTR	Gruppo TRT	SE	P
Fase starter: giorno 0-14				
Peso vivo giorno 14 (g)	381	380	7	0.94
Ingestione media giornaliera (g/capo/giorno)	38.8	36.8*	0.4	0.003
Incremento ponderale giornaliero (g/capo/giorno)	24.2	24.3	0.5	0.83
ICA	1.63	1.53*	0.03	0.04
Fase grower: giorno 14-28				
Peso vivo giorno 28 (kg)	1.69	1.70	0.01	0.54
Ingestione media giornaliera (g/capo/giorno)	135.1	128.6*	1.4	0.003
Incremento ponderale giornaliero (g/capo/giorno)	86.2	87.3	1.3	0.54
ICA	1.57	1.48*	0.02	0.004
Fase finisher: giorno 28-42				
Peso vivo giorno 42 (kg)	3.57	3.68*	0.02	0.001
Ingestione media giornaliera (g/capo/giorno)	214.2	216.0	1.8	0.48
Incremento ponderale giornaliero (g/capo/giorno)	132.5	136.4	2.0	0.19
ICA	1.62	1.58	0.03	0.58
Totale: giorno 0-42				
Mortalità (%)	3.3	3.3	1.1	1
Ingestione media giornaliera (g/capo/giorno)	126.2	123.8	0.9	0.07
Incremento ponderale giornaliero (g/capo/giorno)	79.4	80.5	0.7	0.34
ICA	1.59	1.54*	0.01	0.03

**Tabella 1.** Performance di crescita (n = 20). CTR = dieta standard; TRT = dieta standard + AviPower®2-500 a 300 g/ton; ICA = indice di conversione alimentare. \* Per ciascun parametro gli asterischi indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

### Salute intestinale

Essendo state osservate lesioni di entità lieve non è stato assegnato alcuno scoring e, in Tabella 2, sono presentate le incidenze di queste ultime che non sono state sottoposte ad analisi statistica.

L'incidenza delle lesioni lungo tutto il tratto intestinale è risultata inferiore negli animali trattati rispetto al gruppo CTR. In particolare, nel gruppo CTR sono state osservate lesioni causate da *Eimeria acervulina* nel duodeno di due animali, lesioni da *Eimeria maxima* e da enterite necrotica rispettivamente nel digiuno di quattro ed un animale, ed infine lesioni da *Eimeria tenella* nei ciechi di un animale. Nello stesso gruppo, è inoltre stata riportata un'infezione del sacco vitellino. Al contrario, per gli animali del gruppo TRT, sono state riportate solamente due lesioni causate da *Eimeria maxima*.

	Gruppo CTR	Gruppo TRT
Duodeno	2/20 animali <i>E. acervulina</i>	0/20
Digiuno	4/20 animali <i>E. maxima</i> 1/20 animali enterite necrotica	2/20 <i>E. maxima</i>
Ciechi	1/20 animali <i>E. tenella</i>	0/20
Note	1/20 animali infezione sacco vitellino	Nessuna

**Tabella 2.** Lesioni intestinali al giorno 21. CTR = dieta standard; TRT = dieta standard + AviPower®2-500 a 300 g/ton.

## DISCUSSIONE

Questo studio si prefiggeva l'obiettivo di valutare l'effetto di una miscela microincapsulata di composti botanici utilizzata in seguito ad una vaccinazione per coccidiosi. Gli animali sono stati sottoposti a vaccinazione per coccidiosi con un vaccino vivo attenuato contenente otto ceppi di *Eimeria* spp. e sono state esaminate le performance di crescita ed eventuali lesioni intestinali, valutando l'eventuale effetto positivo di AviPower®2-500.

Durante tutte le fasi dello studio, AviPower®2-500 ha migliorato numericamente o significativamente l'indice di conversione alimentare degli animali trattati, che hanno anche mostrato un peso vivo finale maggiore. Per quanto riguarda le lesioni da coccidiosi osservate al giorno 21, nulla di rilevante è stato segnalato. Questo è in linea con una condizione sperimentale in cui animali vaccinati alla schiusa sono stati successivamente tenuti in condizioni di bassa densità e di buona pulizia. Le lievi lesioni osservate sono state numericamente minori negli animali trattati, indicando un effetto protettivo del prodotto nei siti target delle diverse specie di *Eimeria*. L'azione del prodotto dai tratti prossimali a quelli distali dell'intestino è attribuibile alla tecnologia di microincapsulazione, che permette la protezione dei principi attivi dall'ambiente gastrico ed il loro lento rilascio lungo l'intero tratto intestinale.

Sebbene gli animali non siano stati infettati artificialmente, questi risultati indicano come l'utilizzo di AviPower®2-500 possa avere un effetto positivo sulla mucosa intestinale, prevenendo danni lievi indotti dalla vaccinazione e traducendosi in un miglioramento delle performance di crescita. Infatti, è riportato che la vaccinazione possa influire negativamente sulla crescita, in particolare durante le prime fasi del ciclo dei polli da carne (Das et al., 2021). Questa perdita economica potrebbe quindi essere recuperata con l'utilizzo di questa miscela microincapsulata.

Alla base di questo beneficio c'è il meccanismo di azione di AviPower®2-500. Infatti, la miscela di composti botanici altera la morfologia di *Eimeria* e ne riduce la capacità di invasione della muscosa intestinale (Felici et al., 2020). Nel caso dei ceppi vaccinali, ciò permetterebbe l'immunizzazione degli animali, contenendo allo stesso tempo la loro entrata negli enterociti e limitando i lievi danni causati dalla vaccinazione stessa.

## CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato come la miscela microincapsulata di composti botanici utilizzata abbia il potenziale di migliorare le performance di crescita di polli da carne vaccinati per coccidiosi, avendo anche un effetto protettivo sull'intestino.

## BIBLIOGRAFIA

1. Blake DP, Knox J, Dehaeck B, Huntington B, Rathinam T, Ravipati V, et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet Res.* 2020;51(1):115.
2. Das Q, Shay J, Gauthier M, Yin X, Hasted TL, Ross K, et al. Effects of Vaccination Against Coccidiosis on Gut Microbiota and Immunity in Broiler Fed Bacitracin and Berry Pomace. *Front Immunol.* 2021;12:621803.
3. Felici M, Tugnoli B, Ghiselli F, Massi P, Tosi G, Fiorentini L, et al. Attività anticoccidica in vitro di estratti vegetali. V Simposio Scientifico Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA), Novembre 19, 2020 – Verona, Italy.
4. Tugnoli B, Piva A, Grilli E. 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.
5. Tugnoli B, Piva A, Grilli E. Miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici come supplementi alimentari per il controllo dell'enterite necrotica da *Clostridium perfringens* in polli da carne. VII Simposio Scientifico Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA), Ottobre 28, 2022 – Forlì, Italy.
6. Zaheer T, Abbas RZ, Imran M, Abbas A, Butt A, Aslam S, et al. Vaccines against chicken coccidiosis with particular reference to previous decade: progress, challenges, and opportunities. *Parasitol Res.* 2022;121(10):2749–63.

# STUDIO PRELIMINARE SUL RUOLO DEGLI UCCELLI SELVATICI COME BIOINDICATORI DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA AMBIENTALE

Esposito E., Scarpellini R., Celli G., Marliani G., Zaghini A., Mondo E., Piva S.

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

## Summary

Antimicrobial resistance (AMR) is an issue of global concern impacting human, animal, and environmental health, that requires a One Health approach to investigate all these interconnected elements. Specifically, the environment poses challenges for investigation, but wildlife animals, including wild birds, can act as indicators of environmental AMR contamination. This study wanted to evaluate AMR prevalence in commensal bacteria from wild birds, collected between November 2022 and June 2023 in the Emilia-Romagna region (Italy). Buccal and cloacal swabs were taken from birds that had not received antibiotics in the previous 90 days, and bacterial isolates were identified and tested for antimicrobial susceptibility. A total of 117 bacterial strains were isolated, with 50.4% showing AMR profiles, including a 20.3% of these being multi-drug resistant (MDR). The highest non-susceptibilities were found for tetracycline (12.2%) and enrofloxacin (8.6%) considering all the bacteria isolates, and among Gram-positive isolates for oxacillin (46.8%), clindamycin (29.3%), and rifampicin (20.8%). AMR resulted significantly correlated with rural/urban habitat ( $p=0.031$ ), the province of Bologna ( $p=0.003$ ) and migratory aptitude ( $p=0.031$ ). Our findings suggest that wild birds could be considered potential bioindicators for monitoring AMR in the environment, but further studies are needed to confirm these results and explore additional risk factors.

## INTRODUZIONE

La resistenza antimicrobica (AMR) rappresenta una delle principali minacce per la salute pubblica globale. Pertanto, il fenomeno dell'AMR necessita di essere affrontato attraverso un approccio One Health (WHO, 2014) che comprenda la salute degli esseri umani, degli animali e dell'ambiente (FAO; UNEP; OMS; OIE, 2022). In particolare, la diffusione dell'AMR a livello ambientale costituisce un fenomeno particolarmente difficile da indagare (Samreen et al., 2021). Uno dei possibili metodi per studiarlo è quello di analizzare la diffusione dell'AMR nella fauna selvatica (Carroll et al., 2014; Arnold et al., 2016). Infatti, pur non essendo esposti direttamente ad antimicrobici, gli animali selvatici, possono acquisire batteri resistenti o geni di resistenza antimicrobica (ARGs) da fonti antropiche, incluse quelle agricole e zootecniche, o ambienti contaminati (Carroll et al., 2014; Zanardi et al., 2020); nello specifico, gli uccelli selvatici, grazie alla loro capacità di occupare diverse nicchie ecologiche, di adattarsi a molti ambienti urbani, suburbani e zootecnici, e di migrare a lunga distanza, potrebbero essere considerati come possibili bioindicatori di AMR ambientale (Lin et al., 2022; Russo et al., 2022). L'analisi dei profili di resistenza della flora batterica commensale degli animali, come quella intestinale o orale, è un sistema ampiamente descritto per ottenere informazioni sulla diffusione di batteri e

ARGs considerati importanti in ottica One Health, come gli Stafilococchi resistenti alla meticillina (MRS) o le Enterobacteriaceae produttrici di beta-lattamasi (Russo et al., 2022; Tareen et al., 2023). Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i pattern di resistenza della flora commensale isolata da uccelli selvatici, raccolti nella regione Emilia-Romagna (Italia) da novembre 2022 a giugno 2023, in associazione alle caratteristiche degli uccelli stessi, al fine di indagare il potenziale ruolo degli uccelli selvatici come bioindicatori di AMR nell'ambiente.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

La raccolta dei campioni è stata eseguita tra novembre 2022 e giugno 2023 presso la stazione di inanellamento di Maranello (MO) e la sede della Lega Italiana Protezione Uccelli (LIPU) di Bologna. Sono stati eseguiti un tampone cloacale e uno buccale da uccelli non trattati con antimicrobici nei 90 giorni precedenti al campionamento e per ciascuno di essi è stata compilata una scheda di segnalamento con dati relativi alla specie, l'habitat di provenienza (rurale/urbano, boschivo, umido) l'attitudine (migratoria, stanziale) e l'età (pulli, giovani, adulti).

### *Isolamento, identificazione, test di sensibilità antimicrobica*

L'esame batteriologico è stato eseguito su terreni selettivi per l'isolamento di Enterobacteriaceae (MacConkey Agar) e Stafilococchi (Mannitol Salt Agar). Le colonie sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (Biotyper, Bruker Daltonics, Billerica, MA). Il test di sensibilità, nei confronti di 13 differenti molecole antimicrobiche, è stato eseguito mediante metodica Kirby-Bauer secondo le linee guida del CLSI (CLSI, 2018). Gli isolati che non risultavano sensibili ad almeno un antimicrobico testato sono stati definiti antimicrobico resistenti (AMR), mentre quelli non sensibili ad antimicrobici appartenenti a tre o più classi diverse sono stati classificati come multi-resistenti (MDR) (Magiorakos et al., 2012).

### *Analisi molecolare*

Gli isolati batterici di *Staphylococcus* spp. risultati fenotipicamente resistenti ad oxacillina (1 µg) e cefoxitina (30 µg), sono stati sottoposti ad analisi molecolare mediante PCR end point per il rilevamento del gene *mecA*, considerato il più diffuso indicatore di resistenza alla meticillina, secondo il protocollo di Stegger et al. (2012).

### *Elaborazione statistica*

Le percentuali di AMR e MDR e la non sensibilità verso le singole molecole testate sono state valutate mediante statistica descrittiva; inoltre, la correlazione con i dati ottenuti dal segnalamento degli animali è stata ottenuta con il test di Fisher.

## RISULTATI

Sono stati isolati un totale di 117 ceppi batterici appartenenti a 23 generi e 46 specie diverse. Le specie più frequentemente isolate sono risultate *Escherichia coli* (15.38%) e *Staphylococcus sciuri* (11.1%). Tra gli isolati, 58 (49.6%) hanno mostrato sensibilità nei confronti di tutti gli antimicrobici testati, mentre 59 (50.4%) sono risultati AMR, di cui 12 (20.3%) ceppi multi-resistenti (MDR). È stata osservata un'elevata non sensibilità per la tetraciclina (12.2%) e l'enrofloxacin (8.6%)

considerando tutti gli isolati, e per l'oxacillina (46.8%), la clindamicina (29.3%) e la rifampicina (20.8%) considerando solo gli isolati Gram-positivi. Dall'indagine molecolare per la presenza del gene *mecA*, nessuno degli isolati di *Staphylococcus* spp. selezionati (0%) è risultato positivo. Correlazioni statisticamente significative sono emerse tra AMR e habitat rurale/urbano ( $p=0.031$ ), resistenza ad oxacillina ed enrofloxacin con habitat rurale/urbano ( $p=0.009$ ;  $0.002$ ), resistenza a rifampicina con gli uccelli migratori ( $p=0.031$ ), resistenza a oxacillina ed enrofloxacin con la provincia di Bologna ( $p=0.003$ ;  $0.002$ ).

## DISCUSSIONE

Lo scopo del presente studio è stato quello di indagare il possibile ruolo degli uccelli selvatici come bioindicatori di resistenza antimicrobica ambientale analizzando i profili di resistenza antimicrobica dei loro isolati batterici commensali. Dai nostri dati, il 50.4% dei batteri isolati ha mostrato resistenza ad almeno un farmaco antimicrobico testato (AMR), mentre il 20.3% era MDR. Il tasso di resistenza più alto è stato riscontrato nei confronti della tetraciclina (12.2%), seguita dall'enrofloxacin (8.6%), entrambi antibiotici ampiamente utilizzati in ambito clinico umano e veterinario. La tetraciclina, in particolare, è largamente impiegata nel settore zootecnico. È stato dimostrato che l'interazione di potenziali bioindicatori con l'ambiente circostante, specie in aree sottoposte a significative pressioni di selezione come quelle zootecniche, può riflettere la pressione selettiva esercitata dagli antibiotici (Piva et al., 2020; Messele et al., 2023). Di conseguenza, i nostri risultati sembrano suggerire il potenziale ruolo degli uccelli come indicatori di una pressione di selezione esercitata nel tempo dall'esposizione prolungata a questi antibiotici nell'ecosistema. In uno studio simile di Carter et al. (2018), sono state riscontrate percentuali di resistenza significativamente più elevate per l'amoxicillina (83%), mentre risulta in accordo con i nostri risultati la percentuale di resistenza alla tetraciclina (12%). Di fatto, il range di resistenza antimicrobica negli uccelli selvatici riportato in letteratura varia ampiamente. Le differenze tra i vari studi possono essere attribuite a diversi fattori, come le diverse specie batteriche isolate, l'habitat specifico e la diversa esposizione agli antibiotici degli uccelli, in quanto i profili di resistenza antimicrobica sono influenzati dall'ecologia delle diverse specie di uccelli e dalla loro interazione con l'ambiente (Furness et al., 2017; Carter et al., 2018). Tra i batteri Gram-positivi, abbiamo rilevato percentuali di resistenza rilevanti nei confronti di antibiotici come oxacillina (46.8%), clindamicina (29.3%), rifampicina (20.8%), ma anche nei confronti di antibiotici considerati prioritari per la salute umana come l'ertapenem (4.3%). I tassi di resistenza osservati in animali non trattati evidenziano resistenze presenti nell'ambiente nei confronti di antibiotici di grande importanza per la sanità pubblica globale. Uno studio condotto da Foti et al. (2020) ha mostrato una percentuale più alta di resistenza all'oxacillina, raggiungendo l'81.3% e tassi di resistenza simili nei confronti dei carbapenemi (4.4%). Studi precedenti hanno investigato la resistenza alla meticillina negli uccelli selvatici mediante rilevazione del gene *mecA*, gene target della meticillino-resistenza; uno studio condotto da Tareen e Zahra (2023), ha rilevato che il 18% degli isolati resistenti alla cefoxitina è stato considerato *Staphylococcus* meticillino-resistente (MRS) ed il gene *mecA* era presente nel 64% di questi. Nel nostro studio, nessuno degli isolati di *Staphylococcus* spp. è risultato positivo al gene *mecA*. Tuttavia, l'alta percentuale di resistenza

all'oxacillina tra i nostri isolati necessita di ulteriori indagini; questo risultato, infatti, potrebbe rivelare un'esposizione dell'ecosistema ad agenti antimicrobici di origine antropica (penicillina e i suoi derivati), utilizzati per lungo tempo in contesti clinici, che hanno portato alla comparsa di resistenze e fenotipi eterogenei fra i ceppi di *Staphylococcus* spp.

Dall'analisi statistica è emerso come l'habitat rurale/urbano possa rappresentare un fattore di rischio significativo per la presenza di AMR nell'ambiente. In particolare, la resistenza ad enrofloxacin e a oxacillina ha mostrato correlazioni statisticamente significative in uccelli provenienti da ambienti urbani, riflettendo la maggior esposizione degli uccelli selvatici a fonti di contaminazione antropica. Inoltre, abbiamo osservato un'associazione tra la resistenza all'oxacillina e la provincia di Bologna, potenzialmente correlata al fatto che gli uccelli campionati provenivano tutti da un centro di recupero di animali selvatici, dove la terapia antimicrobica su altri soggetti in trattamento può influenzare la pressione selettiva e la trasmissione orizzontale di resistenze, come dimostrato in studi precedenti che hanno valutato il ruolo dei centri di recupero nella diffusione dell'AMR (Baros Jorquera et al., 2021). Un ulteriore risultato significativo emerso dall'analisi statistica è la correlazione fra la resistenza alla rifampicina e gli uccelli migratori. La rifampicina è il principale farmaco utilizzato nel trattamento della tubercolosi (Dean AS et al., 2022), specie in alcuni paesi come l'Africa e l'Europa dell'Est (Zellweger et al., 2007; Dean et al., 2022:). La maggior parte degli uccelli migratori oggetto del nostro studio, come il pettirosso europeo (*Erithacus rubecula*), la capinera (*Sylvia atricapilla*), il merlo euroasiatico (*Turdus merula*) e il fringuello comune (*Fringilla coelebs*) mostrano una distribuzione e una presenza significativa in alcune parti del Nord Africa (<https://migrationatlas.org/>). Questa correlazione potrebbe suggerire un ruolo degli uccelli migratori non solo come bioindicatori di AMR in relazione al consumo specifico di antibiotici, ma anche come potenziali vettori di resistenze tra aree geografiche diverse; tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini per stabilire con accuratezza questa relazione.

## CONCLUSIONI

Questo studio preliminare, sebbene presenti delle limitazioni come la dimensione ridotta del campione e la scarsa eterogeneità, contribuisce a fornire prove sostanziali sul ruolo degli uccelli selvatici come potenziali bioindicatori della contaminazione ambientale da AMR. I nostri risultati hanno evidenziato una presenza significativa a livello della flora batterica commensale di resistenze agli antimicrobici comunemente usati in medicina umana e veterinaria, ed individuato delle correlazioni coerenti con le caratteristiche degli uccelli, come l'habitat urbano. Tuttavia, futuri studi saranno necessari per ampliare l'eterogeneità del campione, investigare ulteriori pattern di resistenza, identificare nuovi fattori di rischio e comprendere meglio la relazione tra le diverse specie di uccelli, l'ambiente e le complesse dinamiche del fenomeno dell'AMR.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arnold KE, Williams NJ, Bennett M. 'Disperse abroad in the land': the role of wildlife in the dissemination of antimicrobial resistance. *Biol Lett.* 2016;12(8):20160137.

2. Baros Jorquera C, Moreno-Switt AI, Sallaberry-Pincheira N, Munita JM, Flores Navarro C, Tardone R, et al. Antimicrobial resistance in wildlife and in the built environment in a wildlife rehabilitation center. *One Health*. 2021;13:100298. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100298>.
3. Carter DL, Docherty KM, Gill SA, Baker K, Teachout J, Vonhof MJ. Antibiotic resistant bacteria are widespread in songbirds across rural and urban environments. *Sci Total Environ*. 2018;627:1234–41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.343>.
4. Carroll D, Wang J, Fanning S, McMahon BJ. Antimicrobial resistance in wildlife: implications for public health. *Zoonoses Public Health*. 2015;62(7):534-42.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. *CLSI Standard VET01*. 2018.
6. Dean AS, Tosas Auguet O, Glaziou P, Zignol M, Ismail N, Kasaeva T, et al. 25 years of surveillance of drug-resistant tuberculosis: achievements, challenges, and way forward. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(7). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00808-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00808-2).
7. Foti M, Grasso R, Fisichella V, Mascetti A, Zafarana MA, Colnaghi M, et al. Analysis of Eurasian Stone curlew (*Burhinus oedicephalus*) microbial flora reveals the presence of multi-drug resistant pathogens in agro-pastoral areas of Sicily (Italy). *Heliyon*. 2020;6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05401>.
8. Furness LE, Campbell A, Zhang L, Gaze WH, McDonald RA. Wild small mammals as sentinels for the environmental transmission of antimicrobial resistance. *Environ Res*. 2017;154:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.014>.
9. Lin Y, Zhang L, Wu J, Yang K. Wild birds-the sentinel of antibiotic resistance for urban river: Study on egrets and Jinjiang river in Chengdu, China. *Environ Res*. 2023;216(Pt 3):114566. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114566>.
10. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.
11. Messele Y, Werid G, Petrovski K. Meta-Analysis on the Global Prevalence of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Beef Cattle. *Vet Sci*. 2023;10. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070479>.
12. One Health Joint Plan of Action. FAO: Rome, Italy; UNEP: Nairobi, Kenya; WHO: Geneva, Switzerland; World Organisation for Animal Health (WOAH) (founded as OIE): Paris, France. ISBN 978-92-5-136957-9. 2022.
13. Piva S, Giacometti F, Marti E, Massella E, Cabbri R, Galuppi R, et al. Could honey bees signal the spread of antimicrobial resistance in the environment? *Lett Appl Microbiol*. 2020;70(5):349–55. <https://doi.org/10.1111/lam.13288>.
14. Russo TP, Minichino A, Gargiulo A, Varriale L, Borrelli L, Pace A, et al. Prevalence and Phenotypic Antimicrobial Resistance among ESKAPE Bacteria and Enterobacterales Strains in Wild Birds. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(12):1825. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121825>.

15. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *J Glob Antimicrob Resist.* 2021;27:101–11. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>.
16. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mecA or the new mecA homologue mecA(L-GA251). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(4):395–400. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x>.
17. Tareen AR, Zahra R. Community acquired methicillin resistant Staphylococci (CA-MRS) in fecal matter of wild birds - A 'one health' point of concern. *J Infect Public Health.* 2023;16(6):877–83. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.04.002>.
18. World Health Organization. Global report on surveillance. Geneva, Switzerland: WHO Press. 2014. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf?sequence=1).
19. Zanardi G, Iemmi T, Spadini C, Taddei S, Cavirani S, Cabassi CS. Wild Mammals as Bioindicators of Antibiotic Resistance in Ecopathology in Northern Italy. *Animals (Basel).* 2020;10(7):1184. <https://doi.org/10.3390/ani10071184>.
20. Zellweger JP. Treatment of tuberculosis. *Expert Rev Respir Med.* 2007;1(1):85–97. <https://doi.org/10.1586/17476348.1.1.85>.

# PRELIMINARY INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE IN POULTRY AND SYNANTHROPIC BIRDS OF AN URBAN SYSTEM OF SOCIAL AGRICULTURE IN NAPLE

Santaniello A., Russo T.P., Dipineto L., Borrelli L., Mastronardi D., Fioretti A.

*Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, via F. Delpino n. 1, 80137, Napoli, Italia*

## Summary

“Social farming” refers to the set of agricultural and livestock resources put in place to promote rehabilitation activities, social and labor inclusion, useful services to daily life, educational and recreational activities. The increase of Social Farming phenomenon in Italy draws attention to the possibility of transmission of zoonotic pathogens. Information about the role of animals present on the Social Farming as a potential reservoir of pathogenic bacteria is lacking and fragmentary. Therefore, this study was undertaken with the aim to evaluate the presence of potential zoonotic bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp.) in animals kept for the Social Farming activities. The results of the present investigation showed the presence of several bacteria, among them the highest prevalences are recorded for *E. coli* (70.3%), followed by *Klebsiella* spp. (44.4%). The samples were all negative for *Salmonella* spp. Nearly 96.9% of the samples tested were resistant to Amoxicillin-clavulanic acid. The results of the present study show that the poultry involved in the Social Farming activities and pigeons present on the site may act as carriers of potentially pathogenic agents. Thus, during the activities with animals, particular attention is recommended for the potential risk to humans.

## INTRODUZIONE

Durante la Conferenza mondiale sull'ambiente e lo sviluppo di Rio de Janeiro nel 1992 (Earth Summit di Rio) è stato introdotto per la prima volta, a livello internazionale, il concetto di “multifunzionalità”. In Europa questo termine è apparso più tardi, nella Dichiarazione di Cork del 9 novembre 1996, durante la Conferenza europea sullo sviluppo rurale (Dichiarazione di Cork, “Un'Europa Rurale Viva”). Da molti la Dichiarazione di Cork è considerata una vera e propria rivoluzione culturale in quanto, nei dieci punti enunciati nel programma, veniva evidenziata l'importanza della multifunzionalità dell'agricoltura, intesa come settore primario capace di offrire non solo beni alimentari, ma anche come settore capace di erogare servizi di inclusione sociale, benessere e salute alle persone.

L'Agricoltura Sociale (AS) è un fenomeno sempre più in crescita sia in Italia che in Europa e mira a fornire alle nuove generazioni e alle categorie disagiate un'opportunità di formazione nell'ambito della produzione alimentare, delle pratiche agricole e della vita rurale ma anche più in generale di conoscenza di specie animali diverse dal cane e dal gatto. I luoghi in cui viene praticata l'Agricoltura Sociale incoraggiano o consentono il contatto del pubblico con gli animali, offrendo opportunità di educazione e intrattenimento. D'altro canto, le persone che entrano

in contatto con gli animali nei contesti di Agricoltura Sociale (Fattorie Didattiche, Fattorie Sociali, Associazioni di promozione sociale) oltre a beneficiare della relazione interspecifica, sono potenzialmente esposti alla trasmissione di agenti patogeni presenti in uno qualsiasi di questi luoghi, creando pericoli associati all'Agricoltura Sociale. A tal proposito va considerato che contesti ed eventi in contesti di AS attirano un gran numero di persone, in particolare i bambini, i quali rispetto agli adulti hanno comunemente pratiche igieniche meno rigorose e sono più suscettibili a esiti di malattie gravi. Per questo motivo è importante valutare, senza impedirle, le interazioni che l'uomo ha con gli animali e l'ambiente, considerando che il contatto con gli animali può essere un'attività benefica e piacevole, ma non scevra da rischi di tipo zoonosico. Inoltre, bisogna considerare che gli animali possono svolgere un ruolo significativo nella diffusione di batteri antibiotico-resistenti da essi veicolati. L'antibiotico-resistenza è un fenomeno di crescente preoccupazione che riguarda sia la medicina umana che quella veterinaria (Tacconelli et al., 2018). Essa si verifica quando i batteri sviluppano meccanismi di difesa per resistere agli antibiotici, rendendo questi farmaci meno efficaci nel trattamento delle infezioni (Blair et al., 2015). L'uso indiscriminato e inappropriato di antibiotici nella terapia umana e animale è uno dei principali fattori che contribuiscono all'aumento e alla diffusione della resistenza agli antibiotici. L'uso di antibiotici negli allevamenti per scopi terapeutici, profilattici e di promozione della crescita ha contribuito all'emergenza di batteri resistenti agli antibiotici nel settore zootecnico. Questi batteri resistenti possono essere trasmessi agli esseri umani attraverso il consumo di cibo contaminato, il contatto diretto con gli animali o l'esposizione all'ambiente circostante, come l'acqua, il suolo e l'aria (Florez-Cuadrado et al., 2018). Inoltre, la presenza di animali domestici e selvatici portatori di batteri resistenti agli antibiotici rappresenta un'altra via di diffusione dell'antibiotico-resistenza. Gli animali da compagnia, ad esempio, possono facilmente trasmettere batteri resistenti agli antibiotici ai loro proprietari e alle persone con cui entrano in contatto. Allo stesso modo, gli animali selvatici possono agire come vettori di trasmissione di batteri resistenti a livello ambientale.

Pertanto, l'obiettivo della presente indagine è stato di effettuare un monitoraggio sanitario di superfici ambientali, specie aviari sinantropiche e specie avicole allevate presenti presso la sede operativa di un'Associazione di promozione sociale di Napoli, al fine di raccogliere dati preliminari circa la prevalenza di enterobatteri patogeni e dei relativi profili fenotipici di suscettibilità antimicrobica ad essi associati.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Durante il monitoraggio sanitario sono stati raccolti un totale di 92 campioni. In particolare, sono stati campionati 76 animali, appartenenti a 5 diverse specie e 16 superfici ambientali, come riportato nella Tabella 1. Dagli animali sono stati prelevati campioni cloacali mediante tamponi sterili e terreno di trasporto Amies (ThermoFisher, Italia), mentre le superfici ambientali sono state campionate tramite sponge-bags (ThermoFisher, Italia). In particolare, i colombi venivano catturati mediante specifiche trappole a gabbia per piccioni (The Trap Man, Ormskirk, Lancashire, Regno Unito) innescate con granaglie. Le gabbie sono state colloca-

te, la sera prima del giorno del campionamento, nell'area prospiciente alla zona frequentata dal pollame. Ogni colombo catturato è stato campionato utilizzando tamponi sterili con estremità di cotone. Tutti gli animali campionati si trovavano in apparente stato di buona salute e il campionamento è stato effettuato nel rispetto del benessere animale. Tutti i campioni raccolti sono stati processati presso il Centro Sperimentale Avicunicolo afferente al Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni animali per la ricerca di Enterobatteri e la valutazione dei relativi profili fenotipici di suscettibilità agli antibiotici.

Specie animale/superficie	Nome scientifico o dettaglio campioni	Numero campioni
Anatra muta	<i>Cairina moscata</i>	16
Oca cignoide	<i>Anser cygnoides</i>	4
Oca	<i>Anser anser</i>	8
Galline/Galli	<i>Gallus gallus</i>	28
Colombo	<i>Columba livia</i>	20
Superfici ambientali	panchine, tronchi, tavoli, staccionate, mangiatoie, abbeveratoi	16
<b>Totale</b>	<b>92</b>	

**Tabella 1.** Origine dei campioni raccolti.

#### *Isolamento Batterico*

Tutti i tamponi raccolti sono stati trasportati presso il Laboratorio del Centro Sperimentale Avicunicolo entro tre ore dalla raccolta in campo. I singoli campioni sono stati posti in brodo di arricchimento (acqua peptonata; PW; Oxoid, Italia), incubati in aerobiosi a 37°C per 24h. Successivamente, sono stati strisciati su terreni selettivi e differenziali. In particolare, un'aliquota di brodocoltura (10 µl) è stata seminata in terreno MacConkey Agar (Oxoid, Italia) e incubato a 37°C per 24h. Tutte le colonie sono state sottoposte a riconoscimento morfologico, test dell'ossidasi e della catalasi e strisciate in terreni cromogenici quali Tryptone Bile X-Gluc agar (TBX) (Oxoid, Italia) e Brilliance Salmonella Agar (Oxoid, Italia) a 42°C per 24h. Le colonie ottenute sono state crioconservate in Brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, Italia) addizionato con glicerolo (20%) per la successiva identificazione mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight (MALDI-TOF). Per isolamento di Salmonella spp. i campioni di partenza sono stati arricchiti in brodo selettivo Rappaport Vassilladis (Oxoid, Italia) e incubati a 42°C per 24h. Successivamente, le brodoculture sono state strisciate in terreno Verde Brillante (VB) (Oxoid, Italia) a 37°C per 24h. Le colonie sospette, a goccia di rugiada e non fermentanti il lattosio sono state sottoposte a test dell'ossidasi e crioconservate per identificazione al MALDI-TOF come precedentemente descritto.

#### *Identificazione batterica*

Gli isolati raccolti e crioconservati in BHI, sono stati seminati su Nutrient Agar (Oxoid, Italia) e sottoposti ad identificati mediante MALDI-TOF. Le colonie sono

state distribuite su una piastra target in acciaio (BrukerDaltonics, Germania) e sono state ricoperte con 1 µl di acido alfa-ciano-4-idrossicinnamico (HCCA). Una volta che il campione è cristallizzato sulla piastra dedicata all'analisi MALDI, tale supporto viene inserito all'interno dello strumento mediante un sistema che permette il mantenimento del vuoto sia all'interno della sorgente di ionizzazione che dell'analizzatore, impedendo così l'ingresso nello spettrometro a molecole di ossigeno, azoto ed altri gas presenti nell'aria. La tecnica sfrutta la conversione dei peptidi in ioni mediante l'utilizzo di diversi tipi di analizzatori di massa (analizzatori di massa quadrupolici, analizzatori di trappole ioniche, analizzatori del tempo di volo detti TOF). Maggiore sarà la massa della proteina, più lentamente raggiungerà il detector. Il tempo di volo è quindi inversamente proporzionale alla massa. I dati, giunti al rilevatore, vengono elaborati da un software, che genera per ogni campione analizzato uno spettro con masse dai 2.000 ai 20.000 Da. Gli spettri di massa ottenuti da ogni isolato sono stati elaborati con il software MALDI Biotyper 4.1.100 (Bruker, Germania) secondo i criteri della casa produttrice. La soglia di punteggio per la determinazione esplicita a livello di specie è stata impostata a 2.0.

### *Test Antibiogramma*

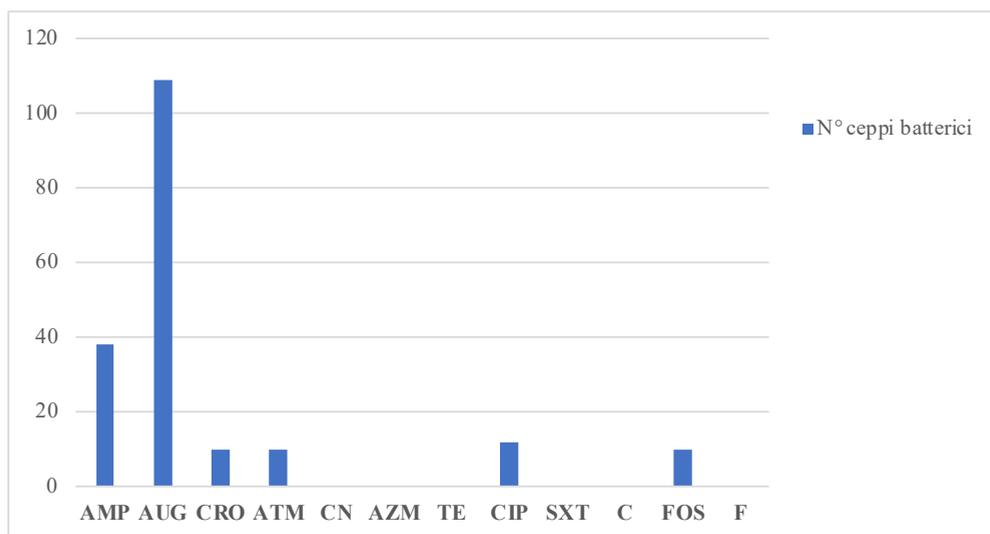
Al fine di saggiare la suscettibilità agli antibiotici, tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti ad antibiogramma mediante la tecnica della diffusione su disco, in accordo con i criteri stabiliti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Per ogni genere/specie sono stati selezionati gli antibiotici previsti dalle tabelle del manuale e in particolare sono stati testati: Ampicillina (AMP, 10µg), Amoxicillina-acido clavulanico (AUG, 20/10µg); Ceftriaxone (CRO,30µg); Aztreonam (ATM, 30 µg); Gentamicina (CN, 10 µg); Azitromicina (AZM, 15 µg); Tetracycline (TE, 30µg); Ciprofloxacina (CIP 5µg), Sulfatrimetropin (SXT, 30µg); Chloramphenicol (C, 30 µg); Fosfomicina (FOS 200 µg), Nitrofurantoin (F, 300µg) (Dischetti per suscettibilità antimicrobica, Liofilchem, Italia). Gli isolati sono stati classificati come suscettibili, intermedi o resistenti in base all'interpretazione del diametro di inibizione in accordo con i criteri del manuale M100-CLSI (CLSI, 2020). Inoltre, tutti i ceppi sono stati sottoposti a test di screening per la detenzione di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) con l'ausilio del test combinato ESBL+AmpC screen disc kit (Liofilchem, Italia).

## **RISULTATI**

Su un totale di 92 campioni analizzati sono stati isolati 116 ceppi batterici, con un'elevata prevalenza della specie *Escherichia coli* (65/92; 70.6%), seguita dal genere *Klebsiella* spp (41/92; 44.5%). *Salmonella* spp. non è mai stato rilevato. Tutti i risultati sono riportati in Tabella 2. Le resistenze antimicrobiche hanno dimostrato frequenze piuttosto basse eccetto per l'amoxicillina-acido clavulanico, nei confronti dei quali il 96.5% (112/116) dei ceppi analizzati ha mostrato resistenza. La seconda resistenza maggiormente registrata, incluse quelle intrinseche, ha riguardato l'ampicillina con il 30.2% (35/116) (Figura 1). Nessun isolato è risultato positivo al test di screening ESBL+AmpC.

Specie animale	N. campioni	Enterobacterales (specie numero ceppi isolati)				
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
Anatre mute	16	11	7	6	-	-
Oche cignoidi	4	2	1	-	-	-
Oche	8	2	-	-	-	-
Galline	28	24	11	-	-	-
Colombi	20	17	9	-	5	2
Panchine	4	2	1	-	-	-
Tavoli	2	1	1	-	-	-
Tronchi	4	3	2	2	-	-
Staccionate	2	2	-	1	-	-
Mangiatoie	2	1	-	-	2	-
Abbeveratoi	2	-	-	-	-	1
<b>Totale</b>	<b>92</b>	<b>65</b>	<b>32</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
		116				

**Tabella 2.** Specie batteriche isolate.



**Figura 1.** Risultati antibiogramma. AMP: Ampicillina (10µg); AUG: Amoxicillina-acido clavulanico (20/10µg); CRO: Ceftriaxone (30µg); ATM: Aztreonam (30 µg); CN: Gentamicina (10 µg); AZM: Azitromicina (15 µg); TE: Tetracycline (30µg); CIP: Ciprofloxacina (5µg); SXT: Sulfatrimetropin (30µg); C: Chloramphenicol (30 µg); FOS: Fosfomicina (200 µg); F: Nitrofurantoin (300µg).

## DISCUSSIONE

I risultati della nostra indagine hanno evidenziato la presenza di numerosi enterobatteri, tra questi le prevalenze più alte si registrano per la specie *E. coli*, seguita dal genere *Klebsiella* spp. Tali agenti fanno parte della comune flora intestinale di numerose specie animali ma sono segnalati da diversi autori come rilevanti patogeni nosocomiali. Gli enterobatteri, infatti, possono essere causa di diverse infezioni, anche gravi, in ambiente ospedaliero (Khatri et al., 2012). *E. coli* costituisce parte integrante del normale microbiota intestinale dell'uomo e di altri animali a sangue caldo. Nonostante la maggior parte dei ceppi siano innocui, alcuni ceppi sono l'agente eziologico di malattie intestinali di diversa gravità (che possono manifestarsi con dolore addominale, vomito, diarrea con sangue) ed extra-intestinali, come ad esempio infezioni del tratto urinario, peritonite, setticemia, polmonite e meningite. Inoltre, i batteri intestinali possono fungere da serbatoio per i geni di resistenza agli antimicrobici in quanto esposti alle pressioni esercitate sulla flora intestinale dell'organismo nel corso della sua vita (Marshall et al., 2009). Di conseguenza, questi ceppi potrebbero acquisire alcuni geni resistenti e/o subire mutazioni che possono variare l'omeostasi microbica nell'ambiente intestinale (Cioacata et al., 2018). Questi cambiamenti nei microrganismi commensali potrebbero rappresentare un rischio di trasferimento di geni resistenti all'uomo, per cui è importante monitorare gli effetti dell'uso di antimicrobici sullo sviluppo della resistenza nei microrganismi commensali di mammiferi e di uccelli (Ohene Larbi et al., 2021). *K. pneumoniae* è considerato un patogeno opportunisto, in quanto causa tipicamente infezioni in soggetti ospedalizzati o comunque immunocompromessi (Podschun e Ullmann, 1998). Questo genere batterico è segnalato nel bestiame. Nei bovini può causare mastite, negli ovini e nei suini, *Klebsiella* può causare polmonite mentre nella produzione avicola, l'infezione da *K. pneumoniae* può causare sinusite, otite e sepsi. Questo batterio fa parte dei patogeni ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp.), un gruppo di microrganismi resistenti agli antimicrobici che rappresentano una minaccia globale per la salute umana. L'acquisizione di geni di resistenza agli antimicrobici da parte dei patogeni ESKAPE ha ridotto drasticamente le opzioni terapeutiche per le infezioni gravi, ha aumentato i tassi di mortalità dovuti al fallimento del trattamento e richiede una risposta globale coordinata per la sorveglianza della resistenza antimicrobica (De Oliveira et al., 2020). Il 96.9 % dei ceppi analizzati nel corso della nostra ricerca, è risultato resistente all'amoxicillina-acido clavulanico. Questo antibiotico è uno degli agenti più ampiamente utilizzato in molti paesi, prescritto principalmente per le infezioni respiratorie e del tratto urinario (Oteo et al., 2009). La resistenza all'amoxicillina-acido clavulanico registrata durante il nostro studio è in linea con i risultati di un'indagine condotta in Cina nel 2022 (Tang et al., 2022). Gli autori cinesi, hanno infatti segnalato che il 90% dei ceppi di *E. coli* isolati da polli erano resistenti alla combinazione amoxicillina-acido clavulanico. In contrasto, i risultati di una ricerca condotta in Ghana nel 2021 (Ohene Larbi et al., 2021) hanno dimostrato che tutti i ceppi isolati da polli da carne erano risultati sensibili all'amoxicillina-acido clavulanico. Il nostro risultato è particolarmente rilevante in quanto, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), l'associazione amoxicillina-acido clavulanico è considerata un "Critically Important Antimi-

icrobial". Questo potrebbe essere dovuto, verosimilmente, al suo ampio uso nella medicina umana e alla sua importanza nel trattamento di varie infezioni batteriche. Infine, molto interessanti risultano anche i dati riferiti alla prevalente presenza di *E. coli* e *Klebsiella* spp., oltreché in minor misura di *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. sia sulle superfici e attrezzature per gli animali con cui vengono a contatto i visitatori o utenti dell'Associazione ma anche le positività registrate a carico dei colombi, che si configurano come potenziali specie infettanti o come disseminatori di infezioni già presenti.

## CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati della presente ricerca confermano che gli animali all'interno di un contesto educativo possono agire come potenziali vettori di agenti patogeni, favorendone la diffusione ambientale. Il monitoraggio degli enterobatteri nell'agricoltura sociale può svolgere un ruolo cruciale in diversi aspetti riguardanti la salute pubblica e potrebbe contribuire a garantire la sicurezza sanitaria degli utenti dell'agricoltura sociale. Alcuni di questi batteri, come *E. coli* e *Salmonella*, possono essere altamente patogeni per l'uomo, e la loro presenza può indicare un possibile rischio di malattia. Inoltre, la presenza di determinati enterobatteri può segnalare una contaminazione fecale del suolo o dell'acqua. Di conseguenza, il loro monitoraggio può rivelare problemi di gestione dei rifiuti o di contaminazione dell'acqua che necessitano di essere affrontati. Infine, essendo la resistenza antimicrobica una preoccupazione crescente anche nell'agricoltura sociale, così come in tutti i settori che coinvolgono la produzione di cibo e la cura degli animali, il monitoraggio delle risposte dei microrganismi agli antibiotici, potrebbe rappresentare una misura per individuare tempestivamente problemi legati a tale fenomeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO and LJV Piddock. (2015). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 42–51.
2. Cioacata G, Fierro RG, Guerra B., et al. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal* 16: 5182.
3. CLSI. (2020). CLSI Supplement M100. In: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed.*, Wayne, PA.
4. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL and MJ Walker. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33: e00181-19.
5. Florez-Cuadrado D, Moreno MA, Ugarte-Ruiz M and L Domínguez. (2018). Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Adv. Food Nutr. Res.* 86: 115–136.
6. Khatri B, Basnyat S, Karki A, Poudel A and B Shrestha. (2012). Etiology and antimicrobial susceptibility pattern of bacterial pathogens from urinary tract infection. *Nepal Med. Coll. J.* 14: 129-32.
7. Marshall BM, Ochieng DJ And SB Levy. (2009). Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance probing the role of commensals in propagating antibiotic resistance should help preserve the efficacy of these critical drugs. *Microbe Magazine* 4: 231–238.

8. Ohene Larbi R, Ofori LA, Sylverken AA, Ayim-Akonor M and K Obiri-Danso. (2021). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* from Broilers, Pigs, and Cattle in the Greater Kumasi Metropolis. *Ghana. Int. J. Microbiol.* 5:5158185.
9. Oteo J, Campos J, Lázaro E, Cuevas O, García-Cobos S, Pérez-Vázquez M, de Abajo FJ and Spanish Members of EARSS. (2008). Increased amoxicillin-clavulanic acid resistance in *Escherichia coli* blood isolates, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1259-62.
10. Podschun R and Ullmann U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 589–603.
11. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18: 318–327.
12. Tang B, Wang J, Zheng X, Chang J, Ma J, Wang J, Ji X, Yang H and B Ding. (2022). Antimicrobial resistance surveillance of *Escherichia coli* from chickens in the Qinghai Plateau of China. *Front. Microbiol.* 13: 885132.

# IMPLICAZIONI DI SICUREZZA ALIMENTARE IN EPISODI DI BOTULISMO IN GALLINE OVAIOLE

Cordioli B.<sup>1</sup>, Zandonà L.<sup>1</sup>, Harper V.<sup>2</sup>, Garbuio M.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Guolo A.<sup>1</sup>, Genovese S.<sup>1</sup>, Ferro T.<sup>1</sup>, Capello K.<sup>3</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba, Treviso, Italia

<sup>2</sup> Medico veterinario libero professionista settore avicolo, Italia

<sup>3</sup> Unità di Epidemiologia Analitica e Biostatistica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Italia

## Summary

In humans, botulism is an intoxication typically caused by ingesting botulinum neurotoxins (BoNTs) released in food by BoNTs-producing Clostridia in favourable environmental conditions.

In recent years, botulism outbreaks in food-producing animals have inexplicably increased in Italy, posing significant but poorly studied public health concerns.

This study will contribute to the risk assessment for humans regarding the consumption of eggs produced during an avian botulism outbreak. To this purpose, we analysed 28 eggs collected from oviducts of laying hens that tested positive for the presence of BoNT mosaic type C/D in their blood.

The eggs resulted negative for BoNT, both in the albumen and in the yolk tested separately through the mouse test. Results suggest that eggs produced by laying hens affected by botulism type C/D do not represent a risk for humans.

## INTRODUZIONE

Il botulismo è una malattia paralitica causata dall'azione della neurotossina botulinica (BoNT) che è la sostanza biologica più tossica conosciuta (Gill, 1982). Essa viene prodotta da specie batteriche diverse, per lo più appartenenti al genere *Clostridium* (C.), sebbene geni codificanti BoNT siano presenti anche in specie batteriche non clostridiche (Mansfield et al., 2015; Brunt et al., 2018). Queste neurotossine causano paralisi flaccida impedendo il rilascio delle vescicole di acetilcolina grazie alla loro attività metalloproteasica esercitata su proteine appartenenti al gruppo SNARE deputate alla movimentazione e alla fusione delle vescicole con la membrana neuronale pre-sinaptica (Montecucco e Schiavo, 1994).

Ad oggi sono noti 7 sierotipi diversi di BoNT identificati con lettere dalla A alla G. Il botulismo umano è sostenuto prevalentemente da BoNTs di tipo A, B, E e F mentre il botulismo animale è essenzialmente causato dai sierotipi C e D (Bano et al. 2017). BoNTs di tipo C e D sono prodotte da *C. botulinum* gruppo III, per il quale è stata proposta la designazione della nuova geno-specie *Clostridium novyi* sensu lato che comprende *C. novyi* e *C. haemolyticum* (Skarin et al., 2011). Oltre a BoNTs di tipo C e D "pure", questi microrganismi possono produrre tossine "mosaico" denominate C/D o D/C a seconda che la componente antigenica prevalente sia rispettivamente di tipo C o D. Queste tossine mosaico sono le più diffuse nei ceppi di origine animale e il tipo C/D è indubbiamente quello implicato nella maggior parte degli episodi di botulismo aviario e anche quello maggiormente tossico per le specie aviari rispetto

agli altri sierotipi (Anza et al., 2014; Bano et al., 2017; Fillo et al. 2021). Tuttavia, in alcuni episodi di botulismo aviare sono stati segnalati anche il sierotipo A ed E che dovrebbero essere sempre esclusi in caso di malattia in quanto implicati in episodi di botulismo umano (Boulianne e Uzal, 2013). Sono 9 i casi umani di botulismo in cui è stato sospettato (n. 5) o confermato (n. 4) il coinvolgimento di BoNT di tipo C (n. 8) o D (n. 1) (Rasetti-Escargueil et al., 2019; Maeda et al., 2023).

La tossina botulinica di tipo C è una sostanza estremamente termolabile in quanto può essere inattivata in 2 settimane a 28 °C, in 2 giorni a 37 °C, in 9 ore a 42°C, in meno di 30 minuti a 56 °C, in meno di 20 minuti a 60 °C e in meno di 5 minuti a 80 °C (Hubálek e Halouzka, 1988). In termini di sicurezza alimentare questa caratteristica suggerisce un rischio basso per le partite di carne di pollame affetto da botulismo di tipo C in quanto vengono consumate previa cottura e soprattutto perché gli animali affetti vengono a morte in pochissimo tempo prima della macellazione. Nel comparto delle galline ovaiole la morte del soggetto colpito può avvenire anche dopo 48 ore dall'inizio della sintomatologia, non impedendo la deposizione, e la malattia si diffonde in allevamento in modo lento anche durante l'intero ciclo produttivo del gruppo.

Ad oggi non è noto se la tossina possa passare nelle uova di animali affetti da botulismo aviare e questa evenienza, qualora confermata, potrebbe rappresentare un rischio per la salute umana in quanto le uova possono essere consumate crude o sottoposte a trattamenti termici non sufficienti a neutralizzare l'eventuale presenza della tossina.

Con il presente studio si è voluta indagare la presenza di neurotossina botulinica nelle uova di soggetti sintomatici in produzione, raccolti in episodi di botulismo aviare confermati, da soggetti con neurotossina in circolo.

## **MATERIALI E METODI**

### *Animali e campionamento*

Tra settembre 2023 e marzo 2024, due sospetti casi di botulismo si sono presentati in gruppi di galline ovaiole di 78 e 88 settimane ospitate in 2 diversi capannoni dello stesso allevamento. Trentacinque soggetti sintomatici sono stati prelevati e conferiti in vita presso la Sezione Diagnostica di Treviso dell'IZS delle Venezie, in 3 diversi momenti. Alla visita clinica gli animali presentavano una sintomatologia paralitica di grado variabile. Negli stadi meno gravi questa era caratterizzata da decubito tarsale intermittente e ptosi delle ali, mentre nei casi più gravi si osservava abbattimento, ptosi palpebrale, incapacità a mantenere il capo eretto (limber neck) e dispnea.

Prima di essere sacrificati, da tutti i soggetti veniva prelevato un campione di siero da sottoporre alla ricerca di tossine botuliniche. Ventotto soggetti presentavano un uovo formato in ovidutto, in prossimità dello sbocco cloacale. L'uovo è stato prelevato e sottoposto anch'esso a ricerca di tossine botuliniche.

I contenuti intestinali e i fegati sono stati prelevati e processati per la ricerca di clostridi produttori di neurotossine botuliniche attraverso prove biomolecolari.

### *Ricerca di tossine botuliniche*

Le tossine botuliniche sono state ricercate attraverso il test d'elezione rappresentato dalla prova biologica su topo (mouse test) condotta secondo la procedura del Centro

di Referenza Nazionale per il Botulismo (CRNB, 2023), e autorizzata sulla base della normativa vigente per la sperimentazione animale (autorizzazione del Ministero della Salute n. 243/2020-PR).

La procedura prevede che, prima dell'inoculazione intraperitoneale, ciascun campione di siero venga suddiviso in 2 aliquote: una inoculata tal quale e l'altra inoculata previo contatto con siero antibotulinico specifico per il sierotipo C (CDC, USA). Tuorlo e albume sono stati separati e processati singolarmente. Ciascun campione d'uovo è stato messo a contatto con pari volume di tampone fosfato gelatina, incubato a 4 °C per almeno 30 minuti, centrifugato 20 minuti (8000 x g). I campioni di siero e uovo tal quali (0,4 mL) sono stati inoculati per via intraperitoneale a ciascuno di 2 topini di peso compreso tra 18 e 25 grammi che sono stati posti in osservazione per 72 ore. Per ridurre il numero di animali impiegati per la sperimentazione animale, si è deciso di allestire e inoculare le aliquote con antitossina solo in caso di morte dei topini testati con i campioni tal quali.

Il campione è stato considerato positivo alla comparsa di sintomatologia neurologica compatibile con botulismo solo nei topini inoculati con il materiale "tal quale" e non in quelli inoculati con i campioni trattati con antitossina (CRNB, 2023).

#### *Ricerca clostridi produttori di neurotossina botulinica*

I contenuti intestinali e i fegati di 10 soggetti sono stati processati in 3 pool (2 pool da 3 soggetti e 1 pool da 4 soggetti). Un grammo di ciascun pool è stato introdotto in 9 mL di Fortified Cooked Meat Medium (FCMM), sottoposto a shock termico a 71 °C per 10 minuti e quindi incubato per 48 ore a 37 °C in condizioni d'anaerobiosi (Bano et al., 2015).

I brodi colturali sono quindi stati sottoposti a real-time PCR per i tipi A, B, E ed F e a multiplex PCR per i tipo C, D e le loro varianti mosaico C/D e D/C (CRNB, 2023b; Anniballi et al., 2013).

I brodi colturali risultati positivi alle prove di biologia molecolare sono stati sottoposti ad isolamento come descritto in letteratura (Bano et al., 2015).

#### *Elaborazione statistica*

Per stimare l'affidabilità da un punto di vista statistico dei risultati ottenuti sulle uova, si è provveduto a calcolare a posteriori la potenza dello studio, basandosi sulla prevalenza attesa per la tipologia di campioni testati e sulla numerosità campionaria, applicando un test binomiale.

## **RISULTATI**

Tutti i sieri testati sono risultati positivi per neurotossine botuliniche di tipo C. Questo metodo non permette di discriminare se si tratta di tipo puro (C) o mosaico (C/D) ma i pool di contenuti intestinali e fegati sono risultati tutti positivi per clostridi produttori di neurotossine botuliniche mosaico di tipo C/D.

Nessun campione di tuorlo e albume è risultato positivo per neurotossina botulinica. Dato che tutti i soggetti da cui è stato ottenuto l'uovo testato sono risultati positivi per BoNT nel siero, era lecito aspettarsi una positività molto elevata (> 90%) anche nelle uova. I risultati ottenuti sulle uova e la numerosità assicurano una potenza pari a 1, e quindi un risultato statisticamente significativo della negatività osservata rispetto all'ipotesi di prevalenza elevata anche nelle uova.

## DISCUSSIONE

Negli ultimi anni si segnala un inspiegabile aumento dei casi di botulismo diagnosticati negli allevamenti avicoli e di vacche da latte nel nostro paese (Zandonà et al., 2023). Sfortunatamente esistono pochi studi che hanno indagato se focolai di botulismo osservati in allevamenti di animali le cui produzioni sono destinate al consumo umano, rappresentano un rischio di sicurezza alimentare.

I risultati ottenuti dimostrano che galline ovaiole affette da botulismo clinico di tipo C/D con BoNT circolante nel sangue, non depongono uova contenenti neurotossina. Questo risultato potrebbe essere dovuto alla vascolarizzazione ovarica che non permetterebbe il passaggio della tossina dal sangue alle uova. Altra possibilità è che la quantità di tossina eventualmente presente all'inizio del percorso in ovidutto dell'uovo, venga neutralizzata nel corso delle 24-25 ore necessarie a percorrerlo, alla temperatura fisiologica di 41- 42 °C dell'animale.

Sono 9 i casi umani di botulismo in cui è stato sospettato (n. 5) o confermato (n. 4) il coinvolgimento di BoNT di tipo C (n. 8) o D (n. 1) (Rasetti-Escargueil et al., 2019; Maeda et al., 2023), ma in nessuno di questi erano coinvolte o sospettate uova o prodotti derivati.

Questo risultato suggerisce di considerare le uova prodotte in un focolaio di botulismo aviario di tipo C/D non un rischio per la salute dell'uomo. Nel caso di coinvolgimento di altri sierotipi, tale rilievo dovrà essere ulteriormente verificato.

## CONCLUSIONI

Le uova prodotte da soggetti affetti da botulismo tipo C/D con neurotossina botulinica in circolo, non sembrano rappresentare un rischio di sicurezza alimentare per l'uomo. Tale osservazione dovrà trovare conferma da studi simili condotti in altri focolai.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anniballi F, Auricchio B, Woudstra C, Fach P, Fiore A, Skarin H, Bano L, Seegerman B, Knutsson R and De Medici D. (2013). Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecure Bioterror*. Suppl 1: S207-214.
2. Anza I, Skarin H, Vidal D, Lindberg A, Båverud V, and R Mateo. (2014). The same clade of *Clostridium botulinum* strains is causing avian botulism in southern and northern Europe. *Anaerobe* 26: 20–23.
3. Bano L, Drigo I, Tonon E, Berto G, Tavella A, Woudstra C, Capello K, and F Agnoletti. (2015). Evidence for a natural humoral response in dairy cattle affected by persistent botulism sustained by non-chimeric type C strains. *Anaerobe* 36: 25-29.
4. Bano L, Drigo I, Tonon E, Pascoletti S, Puiatti C, Anniballi F, Auricchio B, Lista F, Montecucco C and F Agnoletti. (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.
5. Boulianne M and FA Uzal. (2013). Botulism. In: Swine E. D. (Eds.), *Diseases of Poultry* 14<sup>th</sup> ed., Wiley Blackwell Press, Hoboken, NJ, pp. 976-980.
6. Brunt J, Carter AT, Stringer SC, and MW Peck. (2018). Identification of a novel botulinum neurotoxin gene cluster in *Enterococcus*. *FEBS letters* 592: 310-317.

7. CNRB. (2023). Metodo Per La Ricerca Di Clostridi Produttori Di Tossine Botuliniche e Per La Ricerca Di Tossine Botuliniche (Metodo Colturale e Mouse Test) 30.013 rev 3 del 20.01.2023. <https://www.iss.it/documents/20126/8159535/Metodo+CNRB30.013.pdf/6481393f-dfbd-2dfc-fda1-7d814ee0c-74d?t=1674468668175>.
8. 8159535/Metodo+CNRB30.013.pdf/6481393f-dfbd-2dfc-fda1-7d814ee0c-74d?t=1674468668175.
9. CRNB. (2023b). Metodo per la ricerca di Clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR. 32.013 rev.3. <https://www.iss.it/documents/20126/8159535/Metodo+CNRB31.013.pdf/d8911198-2857-2a85-4430-fed9e64503cd?t=1674468738237>
10. Fillo S, Giordani F, Tonon E, Drigo I, Anselmo A, Fortunato A, Lista F and L Bano. (2021). Extensive genome exploration of Clostridium botulinum group III field strains. *Microorganisms* 9: 2347.
11. Gill DM. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological reviews* 46: 86-94.
12. Hubálek Z and J Halouzka. (1988). Thermal sensitivity of Clostridium botulinum type C toxin. *Epidemiology & Infection* 101: 321-325.
13. Maeda R, Mori M, Harada S, Izu I, Hirano T, Inoue Y, Yahiro S, and H Koyama. (2023). Emergence of Novel Type C Botulism Strain in Household Outbreak, Japan. *Emerging Infectious Diseases* 29: 2175
14. Mansfield MJ, Adams JB, and AC Doxey. (2015). Botulinum neurotoxin homologs in non-Clostridium species. *FEBS letters* 589: 342-348.
15. Montecucco C and G Schiavo. (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Molecular microbiology* 13: 1-8.
16. Rasetti-Escargueil C, Lemichez E and MR Popoff. (2019). Public health risk associated with botulism as foodborne zoonoses. *Toxins* 12: 17.
17. Skarin H, Håfström T, Westerberg J, and B Segerman. (2011). Clostridium botulinum group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC genomics* 12: 1-13.
18. Zandonà L, Drigo I, Cordioli B, Genovese S, Moschioni C, Guolo A, Rizzardi A, Tonon E, Viel L, and L Bano. Animal Botulism: a 14-Years Experience of a Veterinary Diagnostic Laboratory. In *Proceedings of the 59th Interagency Botulism Research Coordinating Committee Annual Meeting*. 23-25 ottobre, Madison, WI, USA.

## PREVALENCE OF *CAMPYLOBACTER* SPP. THROUGH THE POULTRY MEAT PRODUCTION CHAIN IN THREE ITALIAN REGIONS

Tirloni E.<sup>1</sup>, Roila R.<sup>2</sup>, Scarano C.<sup>3</sup>, Branciarri R.<sup>2</sup>, Meloni M.P.<sup>3</sup>, Piras F.<sup>3</sup>, Siddi G.<sup>3</sup>, De Santis E.P.L.<sup>3</sup>, Bernardi C.<sup>1</sup>, Addis M.F.<sup>1</sup>, Locatelli C.<sup>1</sup>, Penati M.<sup>1</sup>, Garofolo G.<sup>4</sup>, Marotta F.<sup>4</sup>, Urgesi P.<sup>1</sup>, Fusi V.<sup>1</sup>, Gaviglio A.<sup>1</sup>, De Martini E.<sup>1</sup>, Stella S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, via dell'Università, 6 - 26900 Lodi, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, via San Costanzo, 4 - 06126 Perugia, Italia

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, via Vienna 2, 07100, Sassari, Italia

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100, Teramo, Italia

### Summary

This study is a part of an Italian national project (CAMPITALY) and focuses on the prevalence of *Campylobacter* spp. through the broiler meat production chain in different areas (Northern Italy, Central Italy and Sardinia).

A total of 235 samples were withdrawn from broiler farms (feed, water, litter, shoe covers), slaughterhouses (transport crates, neck skin from carcasses after slaughtering) and retail market (cuts with or without skin, minced meat). All the samples were submitted to the detection of *Campylobacter* spp. by ISO 10272-1 method. Suspect colonies were submitted to species identification by MALDI-TOF.

*Campylobacter* spp. was detected in 119 samples (50.6%); a marked difference among the production phases was observed, with a low prevalence in samples taken at farm (6.8%, shoe covers and litter) and a high frequency in samples withdrawn at slaughterhouses (63.4%) and at retail (59.4%). Among the samples taken at the slaughterhouses, a higher prevalence was detected in neck skin samples than on transport crates (81.6 vs 42.4%), confirming the possible spread of the pathogen by the slaughtering procedures. Among the samples taken at retail, a higher prevalence was detected in meat cuts with skin (65,6% vs 55,1% in meat cuts without skin and 40,0% in minced meats). A total of 303 isolates were identified all belonging to the species *C. jejuni* (71.6%) and *C. coli* (28.4%). The relative prevalence of *C. jejuni* was high in all the sample typologies (60% at farm, 77.2% at slaughterhouse and 68.5% at retail); this species was predominant in all the categories of meats sold at retail, with or without skin or minced (65.1, 71.9 and 83.3%, respectively).

The high prevalence of thermotolerant campylobacters, and in particular of *C. jejuni*, in broiler meat samples marketed in Italy should be carefully considered, suggesting the need for the application of strict hygiene procedures when such meats are prepared by consumers.

### INTRODUZIONE

I *Campylobacter* termotolleranti (e in particolare le specie *C. jejuni* e *C. coli*) esercitano un impatto negativo evidente sulla salute della popolazione europea: essi rappresentano infatti i principali agenti zoonosici nel nostro continente, causando, secondo

i più recenti dati, 137.000 casi/anno (EFSA-ECDC, 2023), ovvero più dell'insieme di tutti gli altri agenti zoonosici. La campilobatteriosi può essere causata dal consumo di diverse tipologie di alimenti (carni, latte crudo, molluschi, vegetali, acqua), ma il ruolo fondamentale, come noto, è giocato dalle carni avicole, responsabili, secondo le stime EFSA, di circa il 20-30% dei casi (EFSA, 2011). Tutte le fasi della filiera produttiva delle carni avicole rivestono un ruolo nella diffusione di questi patogeni nella popolazione animale e sulle carni presenti in commercio. In allevamento, *Campylobacter* è in grado di colonizzare velocemente il tratto intestinale dei broiler, senza causare alcun sintomo evidente (Rossler et al., 2019). *Campylobacter* può essere introdotto nel ciclo produttivo da varie fonti (attrezzature, mezzi di trasporto, operatori, acqua di abbeverata, mangime, lettiera, aria, insetti, ecc.) e la sua diffusione è favorita da carenze nelle procedure di biosicurezza (Koolman et al., 2014). Una volta che il patogeno viene introdotto, buona parte della partita di polli risulta contaminata in pochi giorni, grazie alla sua eliminazione fecale (Barrios et al., 2006). Un recente report EFSA indica una prevalenza di *Campylobacter* spp. nella popolazione di broiler europea pari a circa il 18%, evidenziando la necessità di applicare una stretta sorveglianza in tutta la filiera di produzione (EFSA, 2020). Anche la fase di macellazione rappresenta una fase critica per la diffusione di *Campylobacter*: la contaminazione diretta o indiretta delle carcasse è infatti molto frequente, in particolare nelle fasi di scottatura, spiumatura ed eviscerazione (Pacholewicz et al., 2015; Reich et al., 2018). Ciò determina una elevata prevalenza sulle carcasse (34.9-100% secondo le filiere considerate), con un livello di contaminazione che può raggiungere 103 UFC/g di pelle del collo, come rilevato da dati ufficiali e studi sperimentali (EFSA 2010; Reich et al., 2018; Stella et al., 2021). La prevalenza di questi patogeni nelle carni avicole tende a diminuire lungo la catena di produzione; la conservazione refrigerata delle carni, così come il contatto con l'aria (con conseguente esposizione a condizioni di aerobiosi e asciugatura superficiale) determinano infatti una completa inibizione della moltiplicazione di *Campylobacter*, e una sua graduale inattivazione. Ciononostante, l'enorme diffusione del patogeno sulle carni determina la sua presenza in fase di commercializzazione al dettaglio in un'elevata percentuale di campioni, con il rilievo occasionale di conte elevate (>104 UFC/g) (EFSA-ECDC, 2023; Humphrey et al., 2007; Stella et al., 2017). Le moderne modalità di commercializzazione delle carni di pollo prevedono una filiera particolarmente breve (macello-commercio al dettaglio), riducendo così l'effetto inattivante della conservazione. Inoltre, le normali condizioni di conservazione (confezionamento con film plastico, stoccaggio in ambiente fresco, umido e buio) possono contribuire alla sopravvivenza di *Campylobacter*, determinando la possibile esposizione del consumatore a cariche talvolta elevate del patogeno (EFSA, 2009). Va infatti tenuto conto che, anche se la cottura costituisce un metodo sicuro di inattivazione di questi patogeni, la gestione domestica delle carni avicole presenta una serie di criticità che possono determinare la contaminazione crociata di altri alimenti (mediante attrezzi o superfici di utilizzo comune), a loro volta non sottoposti a cottura prima del consumo (Humphrey et al., 2001; Redmond e Griffith, 2003).

Questo studio si inserisce nell'ambito di un progetto (CAMPITALY, bando PRIN MIUR 2022) che intende fornire informazioni sulla prevalenza di ceppi di *Campylobacter* termofili lungo la filiera di produzione delle carni avicole, e sul rischio correlato alla gestione delle carni avicole da parte del consumatore. In particolare, questa fase è deputata alla rilevazione della presenza di *Campylobacter* spp. in campioni prelevati

in diverse fasi della catena produttiva e alla identificazione delle specie prevalenti, considerando diversi contesti produttivi.

## MATERIALI E METODI

### *Piano sperimentale*

Sono stati prelevati campioni in tre diverse filiere di produzione di carni di pollo, localizzate in Nord Italia (Lombardia), Centro Italia (Umbria) e Sardegna. Per ognuna delle aree considerate, sono stati effettuati prelievi in tre fasi produttive:

Allevamento: i prelievi sono stati effettuati presso 4 diversi allevamenti intensivi convenzionali, in fase avanzata del ciclo produttivo (dopo i 25 giorni di età degli animali).

Sono stati sottoposti a prelievo:

Mangime, prelevato dalle mangiatoie,

Acqua di abbeverata, prelevata dagli abbeveratoi,

Lettiera,

Sovrascarpe dello sperimentatore, dopo aver attraversato il capannone.

Macello: i prelievi sono stati effettuati da:

Gabbie di trasporto degli animali, al momento dello svuotamento,

Pool di pelle del collo degli animali al termine della macellazione.

Commercio al dettaglio: sono state sottoposte a prelievo carni di pollo classificate in tre categorie:

Carni con pelle (polli a busto o parti sezionate),

Carni senza pelle (petti interi, sezionati o affettati),

Carni macinate.

Un riepilogo dei campionamenti effettuati è riportato in Tabella 1.

Fase	Campione	Lombardia	Umbria	Sardegna	Totale				
		N°	Positivi	N°	Positivi	N°	Positivi	N°	Positivi
Allevamento	Mangime	4	0	4	0	2	0	10	0
	Acqua	4	0	4	0	2	0	10	0
	Lettiera	8	0	4	0	2	1	14	1
	Sovrascarpe	4	0	4	0	2	2	10	2
	Totale	20	0	16	0	8	3	44	3
Macello	Gabbie	20	11	10	0	3	3	33	14
	Pelle del collo	20	15	10	10	8	6	38	31
	Totale	40	26	20	10	11	9	71	45
Commercializzazione	Carni con pelle	21	18	20	9	20	13	61	40
	Carni senza pelle	19	14	10	2	20	11	49	27
	Carni macinate	4	4	-	-	6	0	10	4
	Totale	44	36	30	11	46	24	120	71

**Tabella 1.** Esito della ricerca di *Campylobacter* spp. nei campioni prelevati presso l'allevamento, il macello e in fase di commercializzazione al dettaglio.

### *Prelievo e analisi dei campioni*

Le modalità di prelievo dei campioni dipendono dalla loro tipologia. Nel caso del mangime e della lettiera in allevamento, il prelievo è stato effettuato mediante sacchetto sterile, che è stato ribaltato e sigillato dopo il prelievo; i sovrascarpe sono stati prelevati sterilmente e inseriti in un sacchetto da Stomacher sterile, che è stato poi direttamente utilizzato per le analisi; le vaschette di abbeverata sono state sottoposte a prelievo mediante spugnetta sterile, che è stata poi inserita in un apposito sacchetto sterile. Nei prelievi effettuati dalle gabbie al macello, sono state utilizzate spugnette sterili, imbevute con 10 ml di acqua peptonata tamponata; nel caso del prelievo della pelle del collo, i campioni (pool di almeno 3 animali) sono stati prelevati mediante coltello sterilizzato e inseriti in sacchetti da Stomacher sterili (un sacchetto per ogni pool). Infine, per quanto riguarda la fase di commercializzazione al dettaglio, si è proceduto a prelevare le confezioni intere, che sono state o aperte sterilmente in laboratorio al momento dell'analisi; nel caso dei campioni di carni con pelle, si è privilegiato il campionamento della pelle.

Ogni campione è stato sottoposto alla ricerca di *Campylobacter* spp., mediante la metodica ISO 10272-1:2017 (procedimento B), che prevede la diluizione 1:10 del campione con brodo Preston (Nutrient broth n° 2, Oxoid, Basingstoke, UK) con l'aggiunta del 5% di sangue lisato di cavallo (Oxoid), *Campylobacter* growth supplement (Oxoid) e Modified Preston *Campylobacter* selective supplement (Oxoid). Nel caso delle spugne, sono stati aggiunti 90 ml di brodo. L'incubazione è stata effettuata a 41,5°C per 24 h in microaerofilia (Campygen, Oxoid). Successivamente, è stata effettuata la semina per striscio di 10 µl di brodo di arricchimento su terreno CCDA (Scharlab, Barcellona, Spagna). Dopo incubazione a 41,5°C per 44 h in microaerofilia, dalle piastre che presentavano colonie sospette, si è proceduto all'isolamento dei ceppi su agar sangue (Columbia blood agar base, Scharlab) e alla identificazione; sono stati effettuati fino a 5 isolamenti da ogni campione sospetto. Allo scopo di eliminare ceppi interferenti, ogni isolato è stato sottoposto a test dell'ossidasi, e a osservazione microscopica dopo colorazione di Gram ed è stato seminato su piastre di agar sangue incubate per 48 h a 25°C in microaerofilia e a 41,5°C in condizioni di aerobiosi. Gli isolati che presentavano le caratteristiche tipiche del genere *Campylobacter* (Gram negativi con morfologia tipica, ossidasi-positivi, non in grado di crescere a 25°C o in condizioni di aerobiosi) sono stati sottoposti a identificazione.

### *Identificazione dei ceppi*

L'identificazione di specie dei ceppi isolati è stata effettuata mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Fremont, CA), applicando in parallelo due metodiche, ovvero il metodo del trasferimento diretto e il metodo del trasferimento diretto esteso. Nel caso del metodo del trasferimento diretto, il materiale prelevato da una colonia isolata è stato applicato sulla piastra target. I campioni sono stati coperti con 1 µL di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico in 50% acetonitrile con il 2,5% di acido trifluoroacetico (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germania). Nella metodica del trasferimento diretto esteso, le operazioni descritte per il trasferimento diretto sono state precedute dall'aggiunta di 1 µL di acido formico al 70%, prima di applicare la matrice acida. L'acquisizione degli spettri è stata eseguita mediante uno spettrometro di massa microFlex™ (Bruker Daltonik GmbH) in positive mode, dopo calibrazione con Bacterial Test Standard (Bruker Daltonik GmbH). Gli spettri sono stati interpretati

automaticamente mediante software Bruker Compass (4.1). L'identificazione del ceppo veniva acquisita in presenza di un  $\log(\text{score}) \geq 1.7$  per il genere e di un  $\log(\text{score}) \geq 2.0$  per la specie.

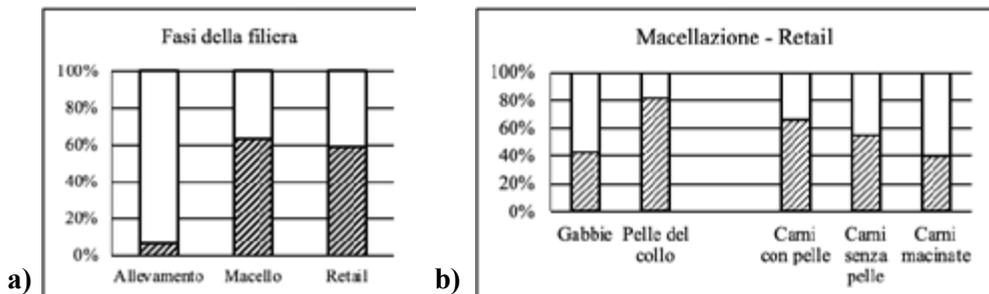
### Analisi statistica

I dati di prevalenza di *Campylobacter* spp. nei campioni analizzati, e la frequenza relativa delle specie *C. jejuni* e *C. coli* nella popolazione di ceppi identificati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test Chi quadro e, in caso di numerosità campionaria bassa, mediante test esatto di Fisher. La soglia di significatività considerata è stata di  $P=0,05$ .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati sottoposti a ricerca di *Campylobacter* spp. un totale di 235 campioni prelevati dalle tre fasi della filiera considerate (allevamento, macellazione, commercializzazione al dettaglio).

I risultati sono mostrati in Tabella 1 e in Figura 1. La presenza di *Campylobacter* spp. è stata rilevata in un totale di 119 campioni, con una frequenza globale pari al 50,6%, ma con una netta differenza fra le fasi della filiera considerate (Fig. 1a). Se, infatti, nella fase di allevamento la contaminazione è stata rilevata solo raramente e solo in una delle filiere valutate, nelle altre fasi il tasso di isolamento è risultato significativamente superiore ( $P<0,01$ ), sia al macello (63,4%), che nella fase di commercializzazione al dettaglio (59,4%); non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i valori ottenuti al macello e durante la commercializzazione ( $P=0,56$ ).



**Figura 1.** a) Prevalenza di *Campylobacter* spp. nei campioni prelevati nelle tre fasi della filiera considerate. b) Prevalenza di *Campylobacter* spp. nelle diverse tipologie di campioni prelevati al macello e in fase di commercializzazione.

In fase di allevamento, la frequenza di isolamento è risultata particolarmente bassa, rispetto ai risultati di studi precedenti (Reichelt et al., 2022). *Campylobacter* è stato isolato solo dalla lettiera e dai sovrascarpe; non è stata rilevata alcuna positività dal mangime o dall'acqua, pur essendo stata campionata dalle vaschette (e quindi potenzialmente esposta ad una contaminazione ambientale/fecale); i dati confermano la maggiore frequenza di positività nei campioni di sovrascarpe e di lettiera già osservata da altri autori. È noto che la frequenza di contaminazione cresce generalmente con l'età degli animali (Barrios et al., 2006); tale fattore non ha avuto un impatto evidente

in questo studio, condotto sempre su partite di animali in una fase abbastanza avanzata del ciclo produttivo.

L'elevata frequenza di isolamento presso il macello, osservata nel nostro studio, era un dato atteso, ed è in accordo con i dati presenti in letteratura (EFSA, 2010). Una frequenza abbastanza elevata (42,4%) è stata rilevata nei campioni prelevati dalle gabbie di trasporto degli animali (Fig. 1b), come era prevedibile dato che si trattava di gabbie non ancora sottoposte a sanificazione: il ruolo delle gabbie nella trasmissione di *Campylobacter* è stato già evidenziato (Morgan et al., 2022), in particolare quando le operazioni di sanificazione sono carenti, favorendo così l'introduzione del patogeno in nuovi cicli produttivi. Una frequenza di isolamento particolarmente elevata (81,6%) è stata rilevata sui campioni di pelle del collo; il valore rilevato è significativamente superiore ( $P < 0,01$ ) a quello osservato sulle gabbie di trasporto. L'elevatissima prevalenza di *Campylobacter* sulle carcasse al termine della macellazione, costantemente rilevata in precedenti studi (EFSA, 2010; Emanowicz et al., 2021), è giustificata dalle tecniche di macellazione comunemente utilizzate: le operazioni di macellazione possono infatti provocare una frequente cross-contaminazione delle carcasse anche di gruppi di animali che non albergano il patogeno a livello intestinale (Rasschaert et al., 2020).

Nella fase di commercializzazione al dettaglio, la prevalenza di *Campylobacter* è risultata molto elevata, come già rilevato in numerosi studi precedenti (Osimani et al., 2017). Questo dato suggerisce la presenza di una esposizione elevata, in termini di frequenza, dei consumatori di carni di pollo, che acquistano e devono poi gestire correttamente carni frequentemente contaminate. Fra le tipologie di campioni analizzate, è stata osservata una frequenza di contaminazione decrescente fra campioni di carni con la pelle (65,6%), carni senza pelle (55,1%) e carni macinate (40,0%). Pur non rilevandosi una differenza statisticamente significativa fra le tre categorie, il trend è risultato evidente. Questo risultato conferma quanto osservato in studi precedenti (Stella et al., 2017): la maggiore frequenza nei tagli anatomici provvisti di pelle è giustificata dalla localizzazione di *Campylobacter* sulle carcasse al termine della macellazione (la pelle, appunto) ed è favorita dalla maggiore possibilità di sopravvivenza del patogeno sulla pelle rispetto alle superfici muscolari esposte (grazie alla presenza dei follicoli e alla minore esposizione all'asciugatura). L'ulteriore lavorazione alla quale le carni sono sottoposte in fase di macinatura espone ulteriormente i *Campylobacter* presenti ai fattori inibenti (presenza di ossigeno, base temperature), riducendone così la vitalità.

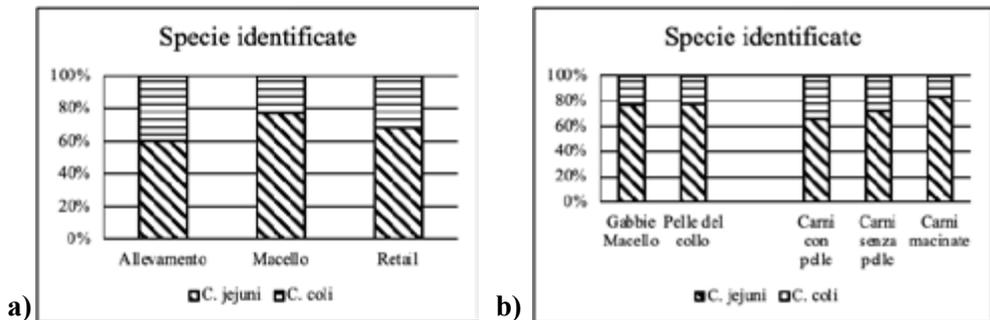
#### *Identificazione di specie*

Dai campioni che presentavano colonie sospette, sono stati isolati e correttamente identificati come appartenenti al genere *Campylobacter* spp. un totale di 303 ceppi; 217 isolati sono stati identificati come *C. jejuni* e 86 come *C. coli* (rispettivamente 71,6 e 28,4%); nessun'altra specie di *Campylobacter* è stata rilevata nei campioni. La maggiore prevalenza relativa di *C. jejuni* nel settore produttivo delle carni avicole è nota, ma la frequenza delle due specie è molto variabile ed è influenzata da molti fattori; negli ultimi anni, la frequenza relativa di *C. coli* sembra infatti in crescita (EFSA, 2010; Andritsos et al., 2023). Come mostrato in Tabella 2 e Figura 2a, la frequenza relativa di *C. jejuni* è risultata superiore nei campioni prelevati al macello (77,2%) rispetto a quelli prelevati in fase di commercio al dettaglio (68,5%) e in allevamento (60%), ma tali differenze non sono risultate significative. Fra i campioni prelevati presso i macelli (Fig. 2b), non sono state rilevate differenze particolari, con una frequenza

costantemente elevata (76,5 – 77,5%) di *C. jejuni*. Precedenti studi hanno ipotizzato una maggiore resistenza di *C. coli* a condizioni ambientali sfavorevoli (basse temperature, conservazione prolungata), che porterebbe ad una sua maggiore frequenza nelle ultime fasi della catena di produzione (commercializzazione al dettaglio) (Oyarzabal et al., 2010); in tale ottica, è ipotizzabile che, tra le tipologie di carni avicole presenti in commercio, le condizioni ambientali siano più sfavorevoli nelle carni prive di pelle e in particolare in quelle macinate. In questo studio, la selezione di *C. coli* lungo la catena di produzione non è stata chiaramente osservata: considerando infatti i dati relativi alla fase di commercializzazione al dettaglio, una frequenza relativa più elevata è stata rilevata nei campioni di carni macinate (83,3%) rispetto alle carni senza pelle (71,9%) e con pelle (65,1%). Il frequente rilievo di *C. jejuni* in carni porzionate deve essere considerato con attenzione, considerando la maggiore patogenicità di questa specie, responsabile di circa il 90% dei casi di campilobatteriosi umana (Gillespie et al., 2002).

Specie	Fase							
	Allevamento	Macellazione			Retail			
		Gabbie	Pelle del collo	Globale	Carni con pelle	Carni senza pelle	Carni macinate	Globale
<i>C. jejuni</i>	3/5	26/34	62/80	88/114	71/109	50/69	5/6	126/184
<i>C. coli</i>	2/5	8/34	18/80	26/114	38/109	19/69	1/6	58/184

**Tabella 2.** Prevalenza di *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nella popolazione di ceppi isolati nelle diverse fasi produttive.



**Figura 2.** a) Prevalenza di *Campylobacter jejuni* e *C. coli* nei campioni prelevati nelle tre fasi della filiera considerate. b) Prevalenza di *C. jejuni* e *C. coli* nelle diverse tipologie di campioni prelevati al macello e in fase di commercializzazione.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio permettono di ottenere un quadro della prevalenza di *Campylobacter* spp. nella filiera avicola; la diffusione di questi patogeni è sicuramente favorita dalle tecniche di produzione (e in particolare di macellazione) utilizzate, e determina una contaminazione molto frequente delle carni in commercio. L'elevata frequenza rilevata in tutte le tipologie di carni, e in particolare l'alta prevalenza relativa

di *C. jejuni*, mostrano la frequente esposizione dei consumatori a questi patogeni al momento dell'acquisto delle carni di pollo. Ciò pone l'accento sulla necessità di una corretta gestione nelle fasi di conservazione e preparazione domestica delle carni, allo scopo di prevenire contaminazioni crociate e ridurre il rischio per i consumatori.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andritsos ND, Tzimotoudis N and M Mataragas. (2023). Prevalence and distribution of thermotolerant *Campylobacter* species in poultry: a comprehensive review with a focus on the factors affecting the detection and enumeration of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken. *Meat. Appl. Sci.* 13: 8079.
2. Barrios PR, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Michel P, Fridriksdóttir V, Gunnarsson E, Stern N, Berke O, McEwen and W Martin. (2006). Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. *Prev. Vet. Med.* 74: 264-278.
3. EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* 8: 1503.
4. EFSA (European Food Safety Authority). (2009). Assessing health benefits of controlling *Campylobacter* in the food chain. Summary report EFSA Scientific Colloquium 12, 4-5/12 2008, Rome, Italy.
5. EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA J.* 9: 2105.
6. EFSA (European Food Safety Authority). (2020). Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. *EFSA J.* 18: 6090.
7. EFSA-ECDC (European Food Safety Authority - European Centre for Disease Prevention and Control). (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA J.* 21: 8422.
8. Emanowicz M, Meade J, Bolton D, Golden O, Gutierrez M, Byrne W, Egan J, Lynch H, O'Connor L, Coffey A, Lucey B and P Whyte. (2021). The impact of key processing stages and flock variables on the prevalence and levels of *Campylobacter* on broiler carcasses. *Food Microbiol.* 95: 103688.
9. Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AW, Painter MJ, Neal KR and the *Campylobacter* Sentinel Surveillance System Collaborators. (2002). A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 937-942.
10. Humphrey TJ, Martin KW, Slader J and K Durham. (2001). *Campylobacter* spp. in the kitchen: spread and persistence. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 30: 115S-120S.
11. Humphrey T, O'Brien S and M Madsen. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 237-257.
12. ISO (International Standardization for Organization). (2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. ISO 10272-1:2017.
13. Koolman L, Whyte P and DJ Bolton. (2014). An investigation of broiler caecal *Campylobacter* counts at first and second thinning. *J. Appl. Microbiol.* 117: 876-881.

14. Morgan RB, Sierra–Arguello Y-M, Perdoncini G, Borges KA, Furian TQ, Gomes MJP, Lima D, Salle CTP, Moraes HLS and VP Nascimento. (2022). Comparison of transport crates contamination with *Campylobacter* spp. before and after the cleaning and disinfection procedure in broiler slaughterhouses. *Poult. Sci.* 101: 101909.
15. Oyarzabal OA, Oscar TP, Speegle L and H Nyati. (2010). Survival of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on retail broiler meat stored at –20, 4, or 12 degrees C and development of Weibull models for survival. *J. Food Prot.* 73: 1438–1446.
16. Osimani A, Aquilanti L, Pasquini M and F Clementi. (2017). Prevalence and risk factors for thermotolerant species of *Campylobacter* in poultry meat at retail in Europe. *Poult. Sci.* 96: 3382-3391.
17. Pacholewicz E, Swart A, Schipper M, Gortemaker BGM, Wagenaar JA, Havelaar AH and LJA Lipman. (2005). A comparison of fluctuations of *Campylobacter* and *Escherichia coli* concentrations on broiler chicken carcasses during processing in two slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* 205: 119-127.
18. Rasschaert G, De Zutter L, Herman L and M Heyndrickx. (2020). *Campylobacter* contamination of broilers: the role of transport and slaughterhouse. *Int. J. Food Microbiol.* 322: 108564.
19. Redmond E and CJ Griffith. (2003). Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *J. Food Prot.* 66: 130-161.
20. Reich F, Valero A, Schill F, Bungenstock L and G Klein. (2018). Characterisation of *Campylobacter* contamination in broilers and assessment of microbiological criteria for the pathogen in broiler slaughterhouses. *Food Control* 87: 60-69.
21. Reichelt B, Szott V, Epping L, Semmler T, Merle R, Roesler U and A Friese. (2022). Transmission pathways of *Campylobacter* spp. at broiler farms and their environment in Brandenburg, Germany. *Front. Microbiol.* 13: **982693**.
22. Rossler E, Signorini ML, Romero-Scharpen A, Soto LP, Berisvil A, Zimmermann JA, Fusari ML, Olivero C, Zbrun MV and LS Frizzo. (2019) Meta-analysis of the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in food-producing animals worldwide. *Zoonoses Public Health* 66: 359-369.
23. Stella S, Soncini G, Ziino G, Panebianco A, Pedonese F, Nuvoloni R, Di Giannatale E., Colavita G, Alberghini L and V Giaccone. (2017). Prevalence and quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in Italian retail poultry meat: Analysis of influencing factors. *Food Microbiol.* 62: 232-238.
24. Stella S, Tirloni E, Bernardi C and G Grilli. (2021). Evaluation of effect of chilling steps during slaughtering on the *Campylobacter* sp. counts on broiler carcasses. *Poult. Sci.* 100: 100866.

## **INDICE DEGLI AUTORI**

## A

Addis M.F. 213  
Andolfatto C. 112  
Anfossi P. 90

## B

Balbiani F. 158  
Bano L. 140, 146, 208  
Bellini S. 38  
Bernardi C. 213  
Bianchi G.B.M. 46  
Bianco L. 112  
Borrelli L. 165, 200  
Bortolami A. 31, 38, 77  
Bosman S. 18  
Bove A. 172  
Bozzo G. 172  
Branciarri R. 213  
Broggi M. 83  
Busquet M. 70

## C

Camarda A. 172  
Canziani S. 38  
Capello K. 208  
Carceller E. 70  
Carlu C. 181  
Carrera M. 38  
Casalino G. 172  
Castaldello I. 77  
Catania S. 77, 124  
Catelli E. 65, 90, 118  
Cecchinato M. 31, 70, 77, 83, 96, 112  
Celli G. 194  
Ceroni S. 83, 124  
Chabrilat T. 181

Chacana P. 158  
Chiapponi C. 38  
Chiari M. 38, 46  
Circella E. 172  
Cordioli B. 140, 146, 208  
Cordovana M. 140  
Coretti L. 165  
Crimaudo M. 31

## D

Dalla Favera F. 65  
D'Amico V. 31  
Dardi M. 70  
Del Zozzo F. 181  
De Martini E. 213  
De Santis E.PL. 213  
Dimuccio M.M. 172  
Dinardo F.R. 172  
Dipineto L. 165, 200  
Dosa G. 65  
Drigo I. 140, 146, 208

## E

Esposito E. 194

## F

Falappa S. 83, 124  
Farioli M. 38, 46  
Fasana S. 118  
Faustini G. 96  
Ferro T. 208  
Fioretti A. 165, 200  
Fortin A. 31  
Franzo G. 70, 77, 83, 96, 112  
Fusaro A. 38, 77  
Fusi V. 213

## **G**

Gagliazzo L. 146  
Garavini G. 65  
Garbuio M. 140, 146, 208  
Garofolo G. 213  
Gastaldelli A. 31  
Gavazzi L. 77  
Gaviglio A. 213  
Genovese S. 208  
Gentile N. 90  
Giovagnoni G. 189  
Girard C. 181  
Giroto E. 140  
Gomez M. 158  
Graziosi G. 65, 90, 118  
Grilli E. 189  
Grilli G. 46, 118  
Guolo A. 140, 146, 208

## **H**

Harper V. 208

## **J**

Joaquim P. 158

## **K**

Kerros S. 181  
Khattak F. 189

## **L**

Laconi A. 31  
Lavazza A. 38, 46  
Leardini S. 77  
Legnardi M. 70, 83, 96, 112  
Lelli D. 46  
Lembo F. 165

Leone A. 124  
Lizzi G. 90, 118  
Locatelli C. 213  
Longoni C. 90  
Luisetto P. 77  
Lupini C. 65, 90, 118

## **M**

Mannelli A. 65  
Marliani G. 194  
Marotta F. 213  
Martini G. 65  
Massaro A. 124  
Mastronardi D. 200  
Meloni M.P. 213  
Miccio L. 70  
Mondo E. 194  
Monne I. 31  
Morales H. 158  
Moreno A. 38, 46  
Musa L. 46, 118

## **N**

Nucci A. 38

## **P**

Palazzolo L. 146  
Panzarin V. 31  
Pasotto D. 70  
Pastori A. 77  
Pedrazzoli S. 90, 118  
Penati M. 213  
Piras F. 213  
Pirota M. 83  
Piva A. 189  
Piva S. 194  
Poletto F. 70, 83, 96, 112

## Q

Quaglia G. 90, 118

## R

Raimondi S. 46  
Rapi M.C. 46, 118  
Rinaldi E. 77  
Rizzardi A. 140  
Roila R. 213  
Romito D. 172  
Rubio J. 158  
Russo E. 90  
Russo T.P. 200

## S

Salaroli R. 90  
Santandrea F. 46  
Santaniello A. 165, 200  
Scarano C. 213  
Scarpellini R. 194  
Scolari A. 21  
Siddi G. 213  
Socas L. 158  
Solé M. 70  
Soliani L. 38  
Stella S. 213

## T

Tata A. 124  
Terregino C. 31, 38, 77  
Tirloni E. 213  
Tonellato F.R. 96  
Tonellato F.R. 83  
Trevisani G. 65  
Trogu T. 38  
Tucciarone C. M. 96

Tucciarone C.M. 70, 83, 112

Tugnoli B. 189

Turco L. 165

## U

Urgesi P. 213

## V

Valastro V. 31  
Varotto M. 31  
Vedana M. 140  
Vereecken M. 146  
Viel L. 77, 208

## Z

Zacometti C. 124  
Zaghini A. 194  
Zanardello C. 146  
Zandonà L. 77, 140, 146, 208

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 diluita: capacità da 280 ml, 1.400 ml o 2.800 ml rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi. Aggiungere dell'acqua a temperatura ambiente (23 ml, 1.115 ml o 2.230 ml di acqua rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi). Agitare il flacone del solvente. Diluire il contenuto del flacone con acqua pulita a temperatura ambiente in un contenitore adeguato. Agitare il flacone del vaccino e diluire il contenuto nella soluzione preparata. Dopo la diluizione si ottiene una sospensione violacea. Riempire il serbatoio del dispositivo nebulizzatore con la sospensione di vaccino preparata. Durante la somministrazione ai pulcini mediante spray a gocce grosse, mantenere la sospensione di vaccino diluito costantemente omogeneizzata, usando un agitatore magnetico. Per migliorare l'uniformità della vaccinazione, è consigliabile tenere i pulcini all'interno del box di trasporto per almeno 1 ora, in modo che possano assimilare tutte le gocce di vaccino. Dopo questo periodo di tempo, posare i pulcini delicatamente sulla lettiera e proseguire con le regolari pratiche di gestione. **POSOLOGIA:** una dose di vaccino (0,007 ml) a partire da 1 giorno di età. **REAZIONI AVVERSE:** nessuna. **TEMPO DI ATTESA:** 0 giorni. **PRECAUZIONI SPECIALI:** i polli nelle prime 3 settimane dopo la vaccinazione devono essere assolutamente allevati a terra. Si raccomanda di eliminare la lettiera e di pulire le strutture e i materiali fra i cicli di produzione per ridurre le infezioni di campo. Non deve essere utilizzata nessuna sostanza anticoccidica o altri agenti con attività anticoccidica attraverso l'alimentazione o l'acqua per almeno 3 settimane dopo la vaccinazione dei polli con questo prodotto, in caso contrario la replicazione corretta delle oocisti del vaccino, e di conseguenza lo sviluppo di un'immunità solida potrebbero essere compromesse. Inoltre, la durata dell'immunità dipende dall'ambiente che permette il riciclo delle oocisti, quindi deve essere tenuto presente che una decisione di utilizzare sostanze anticoccidiche nel periodo di 3 settimane dopo la vaccinazione debba essere presa tenendo in considerazione il potenziale impatto negativo sulla durata dell'immunità di questo prodotto. Conservare e trasportare il vaccino in frigorifero (2 °C-8 °C). Non congelare. Periodo di validità del medicinale veterinario confezionato per la vendita: 10 mesi. Periodo di validità dopo diluizione conformemente alle istruzioni: 10 ore. **CONFEZIONI:** scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® 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.**



**Il vostro partner  
per una gestione  
affidabile della  
salute del  
pollame**



[idexx.info/poultry-academy](https://idexx.info/poultry-academy)

MONITORARE • RILEVARE • INTERPRETARE • CONTROLLARE • PROTEGGERE

**IDEXX**

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<sup>®</sup>

veterinary prevention strategies



**POULVAC<sup>®</sup>**

E. coli

**PER I TUOI ANIMALI  
PER LA SALUTE  
PER TE**



**zoetis**

Finito di stampare  
nel mese di Agosto 2024  
da Litografia La Ducale Srl - Parma

