



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2025



64° CONVEGNO NAZIONALE 10° SIMPOSIO SCIENTIFICO

**Bologna (BO), 6 Giugno 2025
Napoli (NA), 12-13 Settembre 2025**

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2025**

**Bologna (BO), 6 Giugno 2025
Napoli (NA), 12-13 Settembre 2025**

INDICE

Prefazione pag. 15

ATTI DEL 64° CONVEGNO NAZIONALE SIPA

Bologna (BO), 6 Giugno 2025

CONVEGNO

INNOVAZIONE E MULTIDISCIPLINARIETÀ PER MIGLIORARE LA SALUTE, LA SOSTENIBILITÀ E RIDURRE L'USO DI ANTIMICROBICI IN AVICOLTURA

- IL RUOLO DEL MINISTERO DELLA SALUTE NELLA RIDUZIONE DELL'UTILIZZO DEL FARMACO IN AVICOLTURA
Giovanni Filippini..... pag. 18
- IL RUOLO E L'APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA PER LA GESTIONE SANITARIA DEI GRUPPI IN AVICOLTURA
Salvatore Catania pag. 28
- ESPERIENZA DI CAMPO NELLA RIDUZIONE DELL'UTILIZZO DEL FARMACO IN FRANCIA
Claudio Chimienti..... pag. 63
- DALL'ALLEVAMENTO AL CLOUD: COME I BIG DATA RIVOLUZIONANO L'AVICOLTURA
Giovanni Franzo..... pag. 75

ATTI DEL 10° SIMPOSIO SCIENTIFICO

Napoli (NA), 12-13 Settembre 2025

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- INFEZIONE DA POLYOMAVIRUS NEI PAPPAGALLI: VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE VIRALE NEGLI ORGANI E DELLA COMPROMISSIONE DEI TESSUTI COLPITI
Casalino G., Bozzo G., Messina D., Tolini C., Bove A., Lavazza A., D'Onghia F., Lombardi R., D'Amico F., Pellegrini F., Martella V., Camarda A., Circella E.... pag. 83

- VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFICACIA ANTIMICROBICA DEI TIOSULFONATI NEI CONFRONTI DI STIPITI DI *SALMONELLA* APPARTENENTI A SIEROTIPI RILEVANTI
Casalino G., D'Amico F., Bozzo G., Bove A., Salierno D., Romito D., Perna V., Camarda A., Circella E. **pag. 92**
- EFFETTI EPATOPROTETTIVI DI SILIBININA E ACIDO CLOROGENICO IN GALLINE ALLEVATE IN GABBIA AFFETTE DA DISORDINI EPATICI DOPO IL PICCO DI PRODUZIONE: DATI PRELIMINARI
Del Zozzo F., Muscatello V.L., Harper V., Fiorini L., Archetti L.I., Serra V., Carlu C., Tedesco D.E.A., Guerrini A. **pag. 102**
- EVIDENZA DI BATTERIEMIA PRECOCE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* IN POLLI DA CARNE
Garbuio M., Baglioni A., Bacchin C., Guolo A., Vedana M., Zandonà L., Cordioli B., Gobbo E., Meuter A., Borchardt G., Drigo I., Bano L. **pag. 118**
- ASPERGILLOSI IN *SPHENISCUS DEMERSUS*: ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI IN PINGUINI DEL GIARDINO ZOOLOGICO DI PISTOIA
Giordano V., Samarelli R., Petrella A., Pugliese N., Romito D., Cordon R., Cavicchio P., Salierno D., Prioletti M., D'Onghia F., Circella E., Camarda A. **pag. 127**
- DECIFRARE IL MECCANISMO D'AZIONE DI ANTIBIOTICI E COMPOSTI BOTANICI CON TECNICHE IMMUNOMETABOLICHE AVANZATE
Giovagnoni G., Tugnoli B., Perry F., Arsenault R., Grilli E. **pag. 141**
- "BLACK PROVENTRICULUS" NEI BROILER: RILIEVI DIAGNOSTICI DI RECENTI CASI CLINICI ITALIANI E IPOTESI EZIOPATOGENETICHE
Giovanardi D., Garbuio M., Zandonà L., Zanardello C., Vedana M., Baglioni A., Viel L., Laconi A., Piccirillo A., Bano L. **pag. 149**
- METAPNEUMOVIRUS AVIARE E VOLATILI SELVATICI: AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI E METANALISI DEI DATI SU SCALA GLOBALE
Graziosi G., Lupini C., Quaglia G., Lizzi G., Tomasoni R., Catelli E. **pag. 157**
- DINAMICHE DI CIRCOLAZIONE ED EVOLUZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) IN UN ALLEVAMENTO DI SVEZZAMENTO
Legnardi M., Sartore P., Poletto F., Franzo G., Tucciarone C.M., Cecchinato M.
..... **pag. 164**
- BURSITE INFETTIVA AVIARE IN KENYA: CIRCOLAZIONE DI CEPPI VERY VIRULENT IN BROILER VACCINATI
Lizzi G., Quaglia G., Legnardi M., Catelli E., Graziosi G., Tomasoni R., Napolitano M., Messo W., Lupini C. **pag. 171**

- VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI PROTEICHE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA QUALE STRATEGIA DI PREVISIONE DEL RISCHIO ZOOTOTICO E SCENARI FUTURI
Mellace M., Ceniti C., Cataldi M., Borrelli L., Tilocca B. pag. 178
- PREVALENZA DI CIRCOVIRUS IN PAPPAGALLI PET
Noviello E., Pace A., Santaniello A., Borrelli L., Tucciarone C.M., Franzo G., Fioretti A., Cecchinato M., Dipineto L. pag. 195
- EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI IBDV IN ITALIA: COMPARSA DI CEPPI RIASSORTANTI A3B1 NORD OCCIDENTALI E CO-CIRCOLAZIONE CON CEPPI AUTOCTONI
Poletto F., Lizzi G., Legnardi M., Lupini C., Tucciarone C.M., Franzo G., Pedrazzoli S., Quaglia G., Graziosi G., De Nardi M., Catelli E., Cecchinato M. pag. 200
- MICOPLASMOSI AVICOLE: DIECI ANNI DI ISOLAMENTI PER INDAGARE PERSISTENZA E TRASMISSIONE NEI DIVERSI SISTEMI PRODUTTIVI
Rinaldi E., Gastaldelli M., Tondo A., Picchi M., Colò B., Pratavia D., Giacomelli M., Catania S. pag. 211
- SICUREZZA ED EFFICACIA DI UN VACCINO VIVO ATTENUATO PER SALMONELLA ENTERITIDIS APPLICATO DURANTE IL PERIODO DELLA DEPOSIZIONE IN GALLINE OVAIOLE COMMERCIALI
Sisquella L., Badiola I., Vanyò L., Rubio J., Gomez M. pag. 220
- VALUTAZIONE IN VITRO DELLA SOPRAVVIVENZA DI *SALMONELLA GALLINARUM* NEL *DERMANYSSUS GALLINAE*
Salierno D., Pugliese N., Bove A., Giacomazzo M., Giordano V., Casalino G., Lombardi M., Perna V., Circella E., Camarda A. pag. 227
- INDAGINE SULLA PRESENZA DI *ENTEROBACTERIACEAE* IN ALLEVAMENTI AVICOLI FAMILIARI DELLA REGIONE CAMPANIA
Longobardi M., Pace A., Dipineto L., Borrelli L., Fioretti A., Santaniello A. pag. 236
- PRIMO ISOLAMENTO DI *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE* IN UNA GAZZA MARINA NEL SUD ITALIA
Sapio M., Lucibelli F., Minichino A., Aceto S., Balestrieri R., Santaniello A., Fioretti A., Dipineto L., Borrelli L. pag. 240
- DINAMICHE DI CIRCOLAZIONE ED EVOLUZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV) IN UN ALLEVAMENTO DI SVEZZAMENTO
Sartore P., Legnardi M., Poletto F., Franzo G., Tucciarone C.M., Cecchinato M. pag. 247
- ANALISI MLST DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN ALLEVAMENTI ITALIANI: DINAMICHE DI DIFFUSIONE E TRASMISSIONE IN 14 ANNI DI OSSERVAZIONI
Stefani E., Morales-Arce A.Y., Nai G., Righetti V., Gastaldelli M., Colò B., Pratavia D., Giacomelli M., Catania S. pag. 253

- RUOLO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NEL MANTENIMENTO DEL BOTULISMO AVIARE IN GRUPPI DI OVAIOLE COMMERCIALI
Zandonà L., Garbuio M., Guolo A., Drigo I., Moschioni C., Harper V., Anniballi F., Scalfaro C., Taglieri S., Bano L. **pag. 261**
- VALUTAZIONE IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI UN VACCINO INATTIVATO PER LA PREVENZIONE DEL BOTULISMO IN GRUPPI COMMERCIALI DI OVAIOLE
Zandonà L., Tonon E., Genovese S., Garbuio M., Harper V., Drigo I., Viel L., Bano L. **pag. 266**



**PREMIO CORRADO LONGONI
VINCITORE**

- VALIDAZIONE DI UN SAGGIO DI RT-PCR SPECIFICO PER IL GENOTIPO GVIII DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E PRIMA IDENTIFICAZIONE DI CEPPI IB80-LIKE (LINEAGE GVIII-2) IN ITALIA
Legnardi M., Poletto F., Franzo G., Harper V., Bianco L., Andolfatto C., Blanco A., Biarnés M., Ramon L., Cecchinato M., Tucciarone C.M. **pag. 272**

CANDIDATI PREMIO

- CARATTERIZZAZIONE DELL'INTERFACCIA UCCELLI DOMESTICI-FAUNA SELVATICA IN UN'AREA AD ELEVATO RISCHIO DI INTRODUZIONE INFLUENZA AVIARIA
Graziosi G., Lupini C., Dalla Favera F., Martini G., Dosa G., Trevisani G., Garavini G., Mannelli A., Catelli E. **pag. 281**
- 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. 287**
- ANALISI DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM IN CEPPI MULTIRESISTENTI DI *SALMONELLA INFANTIS* ISOLATI LUNGO LA FILIERA PRODUTTIVA DEL POLLO DA CARNE IN ITALIA
Musa L., Toppi V., Stefanetti V., Spata N., Rapi M.C., Grilli G., Addis M.F., Di Giacinti G., Franciosini M.P., Casagrande Proietti P. **pag. 293**
- INDICE DEGLI AUTORI..... **pag. 306**

ROWAN RANGE: Opzioni di razze a crescita più lenta per l'Europa



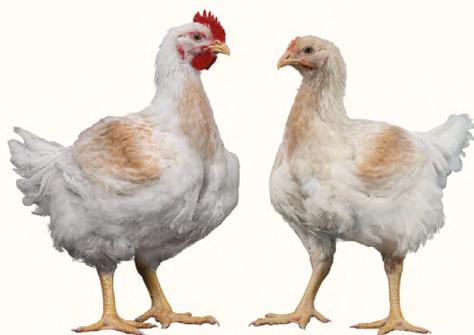
RUSTIC GOLD BROILER

CARATTERISTICHE:

- Tasso di crescita di circa 49-53 g/giorno
- Pollo attivo, vivace e robusto
- Eccezionale efficienza alimentare
- Leader di settore nella resa e qualità della carne
- Vivibilità superiore, salute delle zampe e dei cuscinetti plantari

ACCREDITAMENTI:

- European Chicken Commitment
- RSPCA Assured, Regno Unito
- Dyrevelfaerd (3 HEART), Danimarca
- Lenta Crescita Unaitalia, Italia



ROWAN RUSTIC BROILER

CARATTERISTICHE:

- Tasso di crescita di circa 43-47 g/giorno
- Broiler attivo e vivace
- Forte efficienza in conversione e resa
- Alta robustezza
- Eccellente qualità della carne

ACCREDITAMENTI:

- Beter Leven 1 Star, Paesi Bassi
- Bio-Unaitalia, Italia



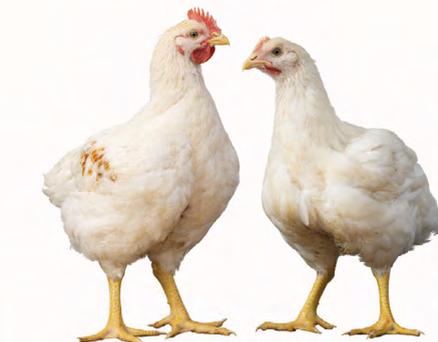
RANGER CLASSIC BROILER

CARATTERISTICHE:

- Tasso di crescita di circa 48-52 g/giorno
- Eccellente benessere e robustezza
- Efficiente Conversione Alimentare
- Superiore resa e qualità carne

ACCREDITAMENTI:

- European Chicken Commitment
- RSPCA Assured, Regno Unito
- Tierschutzlabel "Für Mehr Tierschutz", Germania
- Bio-Unaitalia, Italia



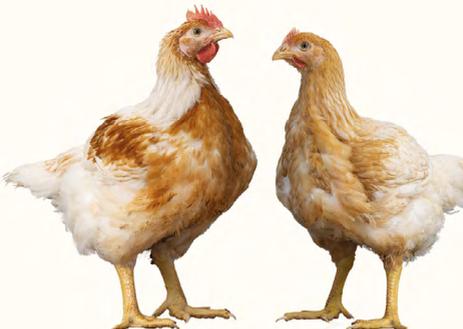
RANGER GOLD BROILER

CARATTERISTICHE :

- Tasso di crescita circa 43-47 g/giorno
- Forte efficienza in conversione e resa
- Robustezza
- Superiore salute delle zampe
- Superiore qualità delle lettiere e qualità eccezionale delle zampe

ACCREDITAMENTI:

- RSPCA Assured, Regno Unito
- Better Leven, Paesi Bassi
- Tierschutzlabel "Für Mehr Tierschutz", Germania
- Dyrevelfaerd (3 HEART), Danimarca
- Bio-Unaitalia, Italia





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*



Foglioletto illustrativo

Primun Salmonella *T*



Foglioletto illustrativo

C CALIER

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



Primun Salmonella *E*

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

Primun Salmonella *T*

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



cevac®
Salmune ETI_K

**Soluzioni complete,
sicure ed efficaci
contro la Salmonella**

**Cevac® Salmune ETI K: una soluzione
completa, sicura ed efficace
contro la Salmonella**



Materiale riservato a Medici Veterinari ed Allevatori professionisti. Per gli Allevatori professionisti: chiedere consiglio al Medico Veterinario.
Ceva Salute Animale S.p.A. Via dei Valtorta 48 - 20127 Milano | marketing.italy@ceva.com | www.ceva-italia.it

Per ulteriori informazioni consultare il foglietto illustrativo su www.prontuarioveterinario.it



PER OGNI PROBLEMA ABBIAMO UNA SOLUZIONE
- ANCHE SENZA ANTIBIOTICI -

FitoDETOXIPUR

Vuoi mantenere
ottime performance?
ABBI FEGATO!

- AZIONE EPATOPROTETTIVA
- MIGLIORA LA SALUTE DEL FEGATO
- OTTIMIZZA LA QUALITÀ DELLE UOVA



20 ANNI DI ESPERIENZA su PRODOTTI NATURALI a base
di OLI ESSENZIALI ed ESTRATTI di PIANTE a PRINCIPI ATTIVI TITOLATI

Forlì (ITALY) - tel. +39 0543 796464 - e-mail: info@chemifarma.it - www.chemifarma.it



Protezione



AviProTM
Salmonella

Previene le infezioni da Salmonella. Proteggendo i tuoi animali, proteggi la salute dei consumatori e il successo della tua attività.

Con la sua esperienza nei prodotti e servizi dedicati, Elanco è al tuo fianco per sostenere il tuo successo in un mercato avicolo in continua evoluzione.

Per le informazioni complete sui prodotti consultare i fogli illustrativi presso: <https://www.prontuarioveterinario.it> | 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

AviProTM
Salmonella DUO

AviProTM
Salmonella Vac E

AviProTM
Salmonella Vac T



ElancoTM

Elanco Italia S.p.A.
Via dei Colatori 12,
50019 Sesto Fiorentino (FI)

AviPro Salmonella DUO: vaccino vivo attenuato contro Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium
AviPro Salmonella Vac E: vaccino vivo attenuato contro Salmonella Enteritidis
AviPro Salmonella Vac T: vaccino vivo attenuato contro Salmonella Typhimurium

AviProTM, Elanco e la barra diagonale sono marchi registrati di Elanco o sue affiliate.
©2025 Elanco. PM-IT-24-0357



CEPPO
ESCLUSIVO
FATRO
NDV 6/10

BIO-VAC NDV 6/10-H120

Vaccino vivo liofilizzato contro la malattia di **Newcastle** e la **Bronchite Infettiva**

Associato SPRAY

- > velocità di utilizzo
- > soluzione sanitariamente ideale



PROTEZIONE

BRONCHITE INFETTIVA

- Elevata protezione
- Vaccinazione di base

NEWCASTLE DISEASE

- Elevata protezione
- Assenza di stress e lesioni

CONFEZIONI
10 flaconi da 1.000 dosi
10 flaconi da 5.000 dosi



PER L'USO CONSULTARE IL MEDICO VETERINARIO



La salute animale per la salute dell'uomo

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO)
Tel. 051 6512711 - www.fatro.it - info@fatro.it



Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2025
sono realizzate grazie al contributo di:



PREFAZIONE

Legnaro (PD), 25 giugno 2025

Come consuetudine, pubblichiamo gli Atti del LXIV Convegno Nazionale e del X Simposio Scientifico.

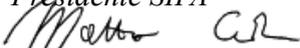
Il nostro convegno “Innovazione e multidisciplinarietà per migliorare la salute, la sostenibilità e ridurre l’uso di antimicrobici in avicoltura” tenutosi a Bologna il 6 giugno ha voluto affrontare le sfide complesse legate alla salute animale, alla sostenibilità ambientale e alla crescente necessità di ridurre l’uso di antimicrobici per contrastare il fenomeno dell’antimicrobico-resistenza (AMR) che l’avicoltura moderna si trova ad affrontare. In questo contesto, l’innovazione e l’approccio multidisciplinare emergono come strumenti chiave per un’evoluzione del settore verso modelli produttivi più responsabili ed efficienti. Tecnologie avanzate come la sensoristica, l’intelligenza artificiale, la genetica di precisione e i sistemi di monitoraggio automatizzati, combinate con competenze provenienti da diversi settori permetteranno una sempre maggiore gestione integrata della salute degli animali. L’obiettivo è quello di migliorare il benessere avicolo, ottimizzare l’uso delle risorse e ridurre l’impiego di antibiotici attraverso strategie preventive. Questo nuovo paradigma richiede cooperazione tra enti di ricerca, operatori del settore e istituzioni, promuovendo un modello di produzione sostenibile, sicuro e in linea con i principi della One Health.

Durante il convegno è stato messo in risalto il virtuosismo della filiera avicola italiana che è considerata una best practice nell’impegno sulla riduzione degli antibiotici, come testimoniato dai dati Classyfarm del 2023 che rivelano un trend in continua diminuzione: -96% di consumo di antibiotici nel pollo e -92% nel tacchino nel 2022 rispetto al 2015, per una riduzione complessiva del -94%.

Il X Simposio Scientifico si terrà a Napoli, una sede storica per la Patologia aviaria italiana, il 12 e 13 settembre e il numero, la qualità delle relazioni presentate e l’allargamento dei gruppi di ricerca che svolgono attività nell’ambito della patologia aviaria mi fa ben sperare sul futuro della nostra società.

Quest’anno si sono svolte le elezioni per il rinnovo del Consiglio Direttivo, che resterà in carica per il triennio 2025-2027. Ai nuovi componenti desidero rivolgere i miei più sinceri auguri di buon lavoro, con l’auspicio che possano portare avanti con entusiasmo e competenza le sfide future. Colgo inoltre l’occasione per esprimere un sentito ringraziamento agli amici del Direttivo uscente, per il prezioso supporto, la collaborazione e l’impegno costante dimostrati durante il mandato appena concluso.

Prof. Mattia Cecchinato
Presidente SIPA



ATTI DEL 64° CONVEGNO NAZIONALE SIPA

CONVEGNO

**Innovazione e multidisciplinarietà
per migliorare la salute, la sostenibilità
e ridurre l'uso di antimicrobici in avicoltura**

Bologna (BO), 6 Giugno 2025



IL RUOLO DEL MINISTERO DELLA SALUTE NELLA RIDUZIONE DELL'UTILIZZO DEL FARMACO IN AVICOLTURA

Giovanni Filippini
Ministero della salute
Direttore generale della DG della salute animale

I DATI DEL SETTORE AVICOLO ITALIANO

- **PRODUZIONE:** 1.328.600 tonnellate di carni avicole (con 1.019.100 tonnellate di pollo e 272.600 tonnellate di tacchino) e 798.00 tonnellate di uova
- **AUTOSUFFICIENZA:** L'Italia è autosufficiente al 105,5% nel settore avicolo e al 97,4% per le uova
- **QUOTA EXPORT:** Nel 2018, le esportazioni di carni avicoliche sono state di 176.800 tonnellate (il 13% della produzione totale), pari a 389 milioni di euro
- **CONSUMI PRO CAPITE:** 21,38 kg di carni avicole pro capite nel 2023, in crescita del 2,9% rispetto al 2022 e 13,5 chili pro capite per le uova

LE SFIDE DELL'AVICOLTURA NAZIONALE

- **CRISI SANITARIE:** influenza aviaria
- **CRISI ECONOMICHE E DI MERCATO:** aumento dei costi di produzione e pressione della GDO
- **CRISI AMBIENTALI E CLIMATICHE:** impattano sulla salute degli animali e la disponibilità di foraggi e cereali
- **CRISI DEI CONSUMI:** maggiore attenzione per diete vegetariane/vegane, preoccupazioni sanitarie (zoonosi, antibiotici), allevamenti intensivi/benessere animale
- **FAKE NEWS**



Salute CORRIERE

Influenza aviaria: mi posso contagiare e come? Posso mangiare le uova e carne di pollo? E bere il latte?



IL PIANO NAZIONALE PER L'USO RESPONSABILE DEL MEDICINALE VETERINARIO E PER LA LOTTA ALL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN AVICOLTURA



**USO PIÙ RAZIONALE DEGLI ANTIBIOTICI E
RIDUZIONE DELLE RESISTENZE**



**Riduzione del consumo di antibiotici
del 40% nel triennio successivo**

- Approccio preventivo (biosicurezza e benessere)
- Formazione continua
- Programmi di immunizzazione
- Divieto colistina
- Limitazioni altri CIA



IL RUOLO DEL MINISTERO DELLA SALUTE NELLA LOTTA ALLA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI

Sorveglianza&Monitoraggio	Prevenzione	Uso prudente degli antibiotici	Formazione/Informazione
<ul style="list-style-type: none"> rafforzare la sorveglianza e il monitoraggio della resistenza agli antibiotici, dell'uso degli antibiotici e del monitoraggio ambientale 	<ul style="list-style-type: none"> rafforzare la prevenzione delle malattie infettive animali e delle zoonosi 	<ul style="list-style-type: none"> promuovere l'uso appropriato degli antibiotici al fine di ridurre la frequenza delle infezioni causate da microrganismi resistenti nell'uomo e negli animali 	<ul style="list-style-type: none"> migliorare la consapevolezza di opinione pubblica e promuovere la formazione di operatori sanitari nella lotta contro la resistenza agli antibiotici
<p>Il Ministero coordina:</p> <ul style="list-style-type: none"> il sistema di sorveglianza nazionale delle resistenze agli antibiotici il sistema di tracciabilità dei medicinali veterinari <p>Il Ministero predisponde:</p> <ul style="list-style-type: none"> relazioni sulle resistenze relazioni* sui consumi di antibiotici 	<p>Il Ministero coordina :</p> <ul style="list-style-type: none"> ClassyFarm per la categorizzazione di allevamenti sul rischio di sviluppo e diffusione di AMR, che include indicatori di biosicurezza, benessere, uso di antibiotici e diagnostica 	<p>Il Ministero predisponde:</p> <ul style="list-style-type: none"> linee guida su uso prudente degli antibiotici nelle diverse specie/categorie animali <p>Il Ministero setta:</p> <ul style="list-style-type: none"> indicatori (per mirare i controlli ufficiali sul rischio) antimicrobial stewardship dashboard 	<p>Il Ministero coordina:</p> <ul style="list-style-type: none"> pagina dedicata all'AMR sul Portale <p>Il Ministero organizza e/o partecipa a:</p> <ul style="list-style-type: none"> eventi, corsi, attività formative

* anche con analisi integrata con il dato umano



Ministero della Salute

SORVEGLIANZA E MONITORAGGIO AMR E ANTIBIOTICI

«Se non si può misurare qualcosa, non si può migliorare»
Lord Kelvin



favorisce la comprensione dello **sviluppo** e della **diffusione** della resistenza e delle **abitudini** di prescrizione



consente di valutare e determinare **tendenze, variazioni** e **fonti** dell'AMR nei batteri e **rischi** legati all'uso di antibiotici



consente di individuare l'**emergenza** di nuovi meccanismi dell'AMR

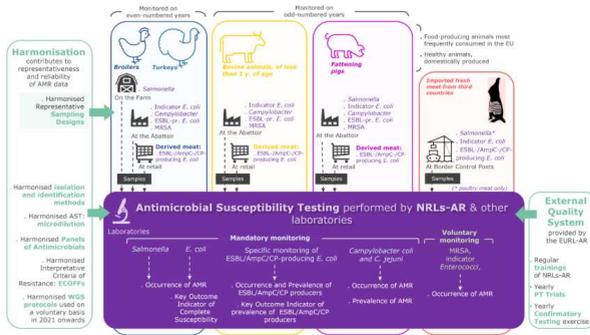


fornisce **dati necessari** all'**analisi dei rischi** per la salute pubblica e animale e per mettere a punto misure mirate

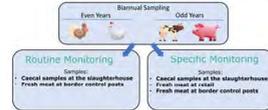


Ministero della Salute

IL PIANO di MONITORAGGIO ARMONIZZATO SULLA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI BATTERI ZOOTONICI E COMMENSALI



➤ piano predisposto annualmente, con rotazione delle specie soggette a controllo:



- quadro, portata e strategia di campionamento standardizzato
- campioni/isolati da allevamenti, macelli, e PCF
- specifiche tecniche per test di sensibilità

↓

dati comparabili e affidabili sull'AMR nell'Unione europea

Fonte EFSA

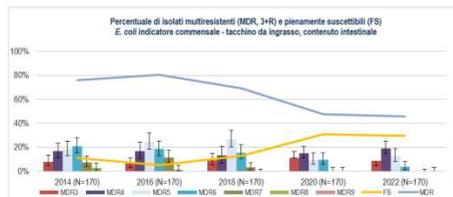
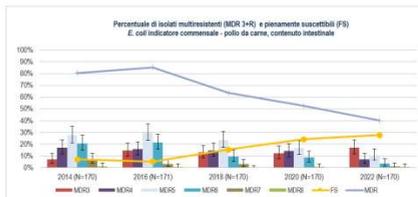


IL PIANO di MONITORAGGIO ARMONIZZATO SULLA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI BATTERI ZOOTONICI E COMMENSALI

I dati del monitoraggio evidenziano che sebbene il fenomeno della resistenza agli antibiotici sia ampiamente diffuso in Italia, l'implementazione di politiche di riduzione e applicazione di principi di uso prudente degli antibiotici hanno consentito, in alcuni casi, di ottenere risultati incoraggianti.

Alcuni esempi nel settore avicolo:

- **diminuzione complessiva della multiresistenza e a un aumento della popolazione completamente suscettibile in *E. coli* indicatore commensale isolato da campioni di contenuto intestinale sia di polli da carne che di tacchini.**



Fonte Ministero della salute – Relazione 2014-2023



IL PIANO di MONITORAGGIO ARMONIZZATO SULLA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI BATTERI ZOOTONICI E COMMENSALI



- a partire dal 2018, si è registrato un **calo considerevole della prevalenza della popolazione di E. coli ESBL/AmpC** nei campioni di intestino cieco derivanti da pollo da carne e tacchini da ingrasso;
- fino al 2020, **non è stato isolato nessun E. coli produttore di carbapenemasi**. Nel 2022, per la prima volta, è stato trovato **un isolato di E. coli produttore di carbapenemasi** in un campione di contenuto intestinale di tacchino (nCP=1/397) e la **presenza di E. coli produttore di carbapenemasi (oltre che di ESBL)** da un'unica unità epidemiologica di pollo da carne.

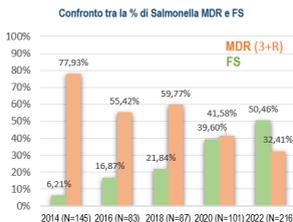
Dal punto di vista epidemiologico la fonte più probabile di introduzione negli allevamenti è quella umana ma l'allevamento rappresenta un amplificatore del fenomeno.



Ministero della Salute

Fonte Ministero della salute – Relazione 2014-2023

IL PIANO di MONITORAGGIO ARMONIZZATO SULLA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI BATTERI ZOOTONICI E COMMENSALI



- nel 2022, una minoranza di isolati di **Salmonella spp.** pari al 10,39% (nFS =16/154), è risultata sensibile a tutte le molecole testate, valore leggermente superiore a quello riscontrato nel 2018 e nel 2020.

- Nel 2022 si conferma il **trend in aumento di Salmonella spp.** della FS in campioni di contenuto intestinale di tacchino



Ministero della Salute

Fonte Ministero della salute – Relazione 2014-2023

IL CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI

Progetto ESVAC:

- Partecipazione volontaria
- Solo dati di vendita
- Solo antibiotici

2030+

Scadenza: **ogni 30 giugno**
Report: **ogni 31 dicembre**

2030

Dati di vendita e uso
in tutti gli animali,
anche da compagnia



2027

Dati di vendita e uso
in tutti gli animali
produttori di alimenti



2025

Primo report by EMA
(31 marzo 2025)



2024

Dati di vendita e uso
per bovini, suini,
polli e tacchini



2023

Piattaforma ASU



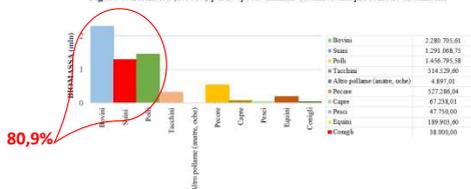
Sistema ESAUvet:

- Obbligatorio
- Dati di vendita e di uso (per specie/categorie)
- Antimicrobici



IL CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI: LE VENDITE DEL NUOVO SISTEMA ESAUET

Figura 3. Biomassa (1.000 t) per le specie animali destinate alla produzione di alimenti



542,3 tonnellate di principi attivi antibiotici
venduti come conseguenza di una REV

87,2 mg/kg

- le **soluzioni orali**, le **premiscelate** e le **polveri orali** rappresentano il 90,7% delle vendite totali negli animali destinati alla produzione di alimenti;
- le principali classi di antimicrobici vendute sono **penicilline** (33,2%), **tetracicline** (19,2%) e **sulfamidici** (13,2%);
- netta prevalenza degli antibiotici appartenenti alla **categoria D "Prudenza"** (68%), seguiti da quelli della categoria C "Attenzione" (30,8%) e dagli antibiotici della categoria B "Limitare" (1,2%).

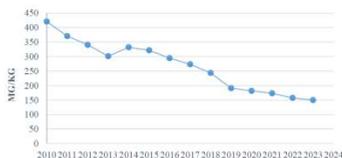
Classi antibiotici – Categoria B

Classi antibiotici	mg/kg
Cefalosporine 3 ^a -4 ^a generazione	0,04
Fluorochinoloni	0,44
Altri chinoloni	0,27
Polimixine	0,33



IL CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI: LE VENDITE SECONDO IL PROGETTO ESVAC

Figura 13. Trend 2010-2023 delle vendite totali (mg/PCU) degli antibiotici nelle specie animali destinate alla produzione di alimenti



Target PNCAR

	2010	2023	Differenza
Vendite totali (mg/PCU)	421.1	150.1	-64,4%
Vendite totali (mg/PCU)	294.7	150.1	-49,1%
Vendite totali (mg/PCU)	181.8	150.12	-17,4%

antibiotici per via orale:
- 18% rispetto al 2020
- 50,9% rispetto al 2016

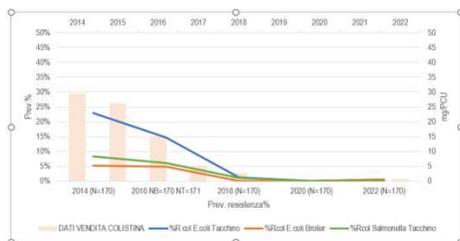
	2016	2020	2022	2023	Comparato con 2016
Cefalosporine di 3 ^a e 4 ^a generazione (mg/PCU)	0,38	0,16	0,08	0,07	-81,6%
Fluorochinoloni (mg/PCU)	2,33	1,23	0,90	0,77	-67%
Altri chinoloni (mg/PCU)	2,42	0,78	0,38	0,47	-80,6%
Polimixine (mg/PCU)	15,10	0,70	0,58	0,57	-96,2%

Fonte Ministero della salute – Relazione ESUAVET 2023



L'IMPORTANZA DI ANALIZZARE I DATI CONGIUNTAMENTE AI DATI DI IMPIEGO

Esemplare è il caso della drastica riduzione e mantenimento di basse frequenze di resistenza alla **colistina**, a seguito dell'attuazione da parte delle filiere produttive (e specialmente di quella del tacchino) delle raccomandazioni sull'uso prudente da parte delle istituzioni di sanità pubblica veterinaria.



% R alla colistina *E. coli* e *Salmonella spp.* isolati da campioni di contenuto intestinale di pollo da carne e tacchino da ingrasso

	2014	2016	2018	2020	2022
%R Colistina <i>E. coli</i> Tacchino	22,94%	14,71%	1,2%	0%	0,59%
%R Colistina <i>E. coli</i> Pollo da carne	5,3%	4,9%	0%	0%	0,59%
%R Colistina <i>Salmonella spp.</i> Tacchino	8,28%	6,02%	1,15%	0%	0%

Fonte Ministero della salute – Relazione 2014-2023

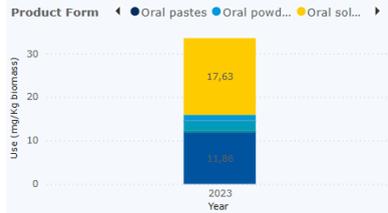


IL CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI: L'IMPIEGO

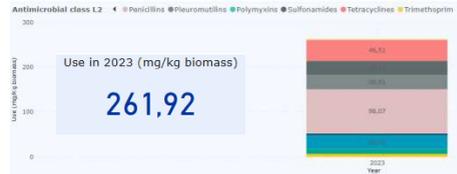
BOVINI



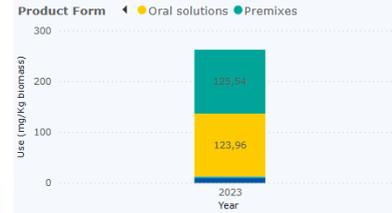
Use Trends by Product Form



SUINI



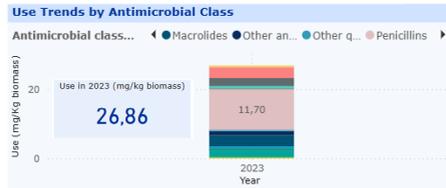
Use Trends by Product Form



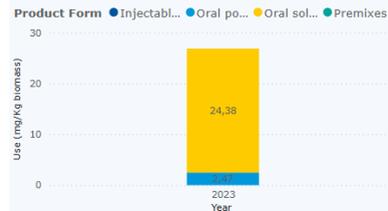
Ministero della Salute

IL CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI: L'IMPIEGO

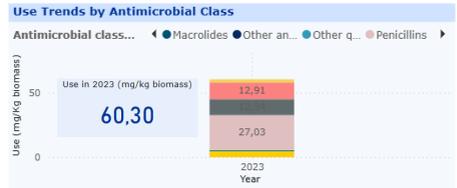
AVICOLI



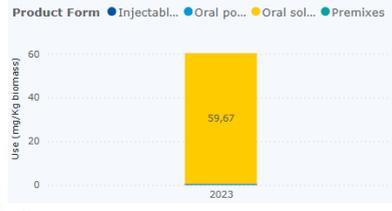
Use Trends by Product Form



TACCHINI



Use Trends by Product Form

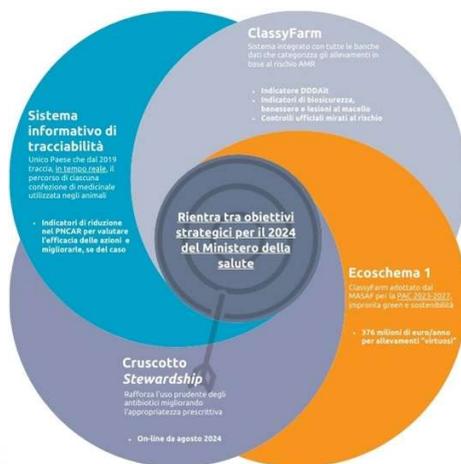


Ministero della Salute

LE POLITICHE DI RIDUZIONE E USO PRUDENTE DEGLI ANTIBIOTICI DEL MINISTERO DELLA SALUTE

Settore veterinario

- Strategia di contrasto all'AMR inglobata pienamente nel PNCAR dal 2017
- Strategia che concorre al raggiungimento degli obiettivi comuni
- Strategia che integra le azioni e gli obiettivi tra i diversi stakeholder, "interni" ed "esterni"
- Strategia che fa della comunicazione dei dati un punto di forza - **aumento della consapevolezza**



Ministero della Salute

LE POLITICHE DI RIDUZIONE E USO PRUDENTE DEGLI ANTIBIOTICI DEL MINISTERO DELLA SALUTE



STRUMENTO NON COGENTE

Utile per **condividere** problematiche poste dalla resistenza antimicrobica fra medici veterinari liberi professionisti e quelli impiegati in istituzioni pubbliche, [...] con la finalità di **attuare un confronto costante** circa le scelte ragionate di trattamento dell'animale.



Ministero della Salute

Il ruolo dell'appropriatezza diagnostica per la gestione sanitaria dei gruppi in avicoltura



Salvatore Catania

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

64° CONVEGNO ANNUALE SIPA
Bologna, 6 giugno 2025

● Programma

- La medicina di laboratorio in ambito Medico Veterinario
- Medicina Basata sulle Evidenze
- Appropriatezza nella pratica
- Il percorso diagnostico e come ristabilire un equilibrio alterato (la terapia)
- Storia del progetto ed evoluzione del sistema
- Conclusioni

● L'evoluzione della medicina di laboratorio



● Il percorso storico evolutivo

- Esperienze personali o dei colleghi (aree di intervento limitate)
- Sviluppo delle metodiche di laboratorio

● Passaggio tra medicina deterministica a medicina probabilistica

- Evans vs Koch

Clinical Microbiology and Infection 22 (2016) 583–584



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



Editorial

Evolution of the Koch postulates: towards a 21st-century understanding of microbial infection



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



5



● Il revisionismo scientifico è la radice della modernità

- Quali nuovi orizzonti apre questa affermazione ?
- Le conoscenze che ho appreso durante gli studi sono diventate obsolete
- Cerco di tenermi aggiornato, ma mi sembra di non farcela
- So di non poter sapere “tutto” e quindi riconosco che la mia incertezza è legittima



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



6



● E allora che fare ?

.....posso imparare a conoscere le fonti a cui
attingere per aggiornare le mie conoscenze e
modificare miei comportamenti

● Ma.....

- Notevole produzione della ricerca in campo medico
- Allontanamento dei medici di campo dalle innovazioni scientifiche



● Tutto ciò può creare difformità di approcci



● In particolare in una organizzazione multicentrica



● La rete degli IIZZSS



● Procedure/Protocolli/Linee Guida

- **Contribuiscono alla riduzione di quella parte di variabilità nelle decisioni cliniche** che è legata alla carenza di conoscenze e alla soggettività nella definizione delle scelte diagnostiche (qualità del sistema)



● Medicina Basata sull'Evidenza (EBM) ed il passaggio a Evidence Based Practice (EBP)

- La EBM costituisce un approccio alla pratica clinica dove le **decisioni cliniche risultano dall'integrazione tra l'esperienza del medico e l'utilizzo consenzioso, esplicito e giudizioso delle migliori evidenze scientifiche disponibili**, mediate dalle preferenze del paziente

Sackett et al., EMJ 1996

- Evidence Based Practice (EBP) è descritta come il **“fare la cosa giusta nel modo giusto”**(Muir Gray 1997), questo significa non soltanto fare le cose più efficientemente e nel miglior standard possibile, ma anche assicurare che ciò che viene fatto sia giusto. Esempio...dolore al petto RX o ECG

● Solo un esempio per ...

- TRIAGE (come vengono decise le analisi da eseguire)



● Solo un esempio per ...

● TRIAGE



Salvatore Catania, 6 giugno 2025

Ministero della Salute

15



● Solo un esempio per ...

● TRIAGE



Salvatore Catania, 6 giugno 2025

Ministero della Salute

16



● **NON** Solo un esempio per ...

- **Sospetto corretto ma test inappropriato** scarse possibilità di raggiungere l'obiettivo (Sierologia e ricerca antigene)

● **MG**



● TRT



● Evidence Based Practice (EBP) in Medicina Veterinaria

- In medicina veterinaria tale dottrina può tradursi in un approccio alla diagnostica **secondo cui le decisioni derivano dall'integrazione tra l'esperienza del medico di laboratorio e l'utilizzo coscienzioso, esplicito e giudizioso delle migliori evidenze scientifiche disponibili, mediate dall'utilizzo appropriato delle metodiche analitiche e STATISTICHE a disposizione**

● **Da non dimenticare.....**

La padronanza di tale disciplina non sostituisce l'esperienza e le abilità del professionista, ma le organizza, le amplia e le completa.

● **Dal punto di vista dell'organizzazione**

- Riduzione degli scostamenti dovuti a scelte individuali
- Maggiore omogeneità (livellamento verso l'alto)
- Efficienza
- Gestione oculata delle risorse disponibili (esempio BVD Elisa Vs PCR)

● Dal punto di vista del cliente/utente

- **Maggiore omogeneità dei servizi**

- Tempi di risposta adeguati

- **Riduzione dei costi**

● Cosa è il laboratorio

- Un mero esecutore di esami?

-oppure può essere un interlocutore del processo diagnostico?

- ... da alcuni addirittura è stato definito come “motore di appropriatezza”

● Cosa ci siamo proposti?

- Di applicare tali sistemi di appropriatezza alla **nostra quotidianità diagnostica**, in particolare in un settore particolarmente complesso come la necropsia diagnostica degli animali domestici, **ma ciò non significa che questo risulta essere l'unico settore a cui possiamo applicare tali principi... ma.....**
- Dal **2013** abbiamo intrapreso un percorso basato su tali evidenze che ci ha permesso di sviluppare diversi protocolli di approccio diagnostico alle problematiche del settore avicolo nelle differenti categorie produttive

● Storia del progetto ed evoluzione

- **Evoluzione della medicina** da «arte medica » a medicina basata sulle evidenze
- [Formazione di gruppi di lavoro specifici coinvolti in differenti PO](#)
- [Linee guida e stesura di protocolli](#)
- **Un sistema di revisione delle attività svolte nel corso dell'anno finalizzato ad evidenziare le eventuali criticità e proporre quindi i miglioramenti ai protocolli (un sistema che si può autoalimentare sui propri «errori» e trova le aree di miglioramento da rivedere) Sistema Qualità**

● **Formazione di gruppi di lavoro specifici coinvolti in differenti PO**

- Gruppo Animali da Compagnia
- **Gruppo Avicolo**
- Gruppo Buiatrico
- Gruppo Ovi-caprini
- Gruppo Suinicolo
-

● **Linee guida e stesura di protocolli**

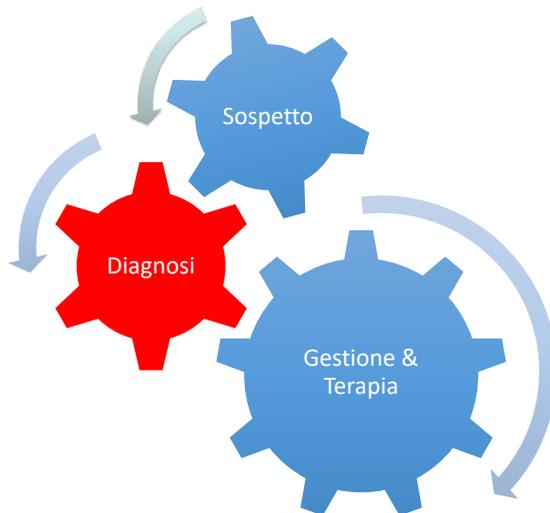
- Questi protocolli sono focalizzati alla diagnosi di malattie infettive con la duplice funzione di **fornire un servizio qualificato al cliente** e nel contempo svolgere al meglio il **nostro ruolo di osservatorio epidemiologico attraverso l'esecuzione della sorveglianza passiva**
- Attualmente abbiamo **definito differenti protocolli diagnostici** suddivisi per categoria produttiva e tipo di sindrome/lesione (ad esempio “bovino enterico vitello”, “bovino enterico adulto”, “bovino respiratorio”).
- Protocollo diagnostico per specie (vedi Web Quality)

● **Il progetto è ancora in progress ...**

- Ma adesso apriamo una parentesi sulla terapia per poi tornare allo sviluppo del progetto più generale

● **Perché facciamo diagnosi???**

● II LABORATORIO DIAGNOSTICO COME STRUMENTO UTILE PER LA DIAGNOSI



● LABORATORIO DIAGNOSTICO COME STRUMENTO DAGONOSTICO



- Individuare la cause o le cause della problematica, o almeno favorire l'individuazione di queste
- Fornire indicazioni possibilmente oggettive per una adeguata gestione delle problematiche

● Perché fare diagnosi... in passato

- Per individuare la causa/le cause di alterazione dell'equilibrio
 - Ridurre il danno economico
 - Verificare/modificare i protocolli vaccinali
 - Individuare la terapia più appropriata/efficace/razionale
 - Ridurre i costi di trattamenti farmacologici sbagliati

● Perché fare diagnosi ... adesso

- Per individuare la causa/le cause di alterazione dell'equilibrio
 - Ridurre il danno economico
 - Verificare/modificare i protocolli vaccinali
 - Individuare la terapia più appropriata/efficace/razionale
 - Ridurre i costi di trattamenti farmacologici sbagliati
 - **RIDURRE IL RISCHIO DI SELEZIONE DI MICROORGANISMI FARMACORESISTENTI**

● **Antimicrobial Stewardship** definizione

- Il termine *Antimicrobial Stewardship* si riferisce ad una **serie di interventi coordinati, che hanno lo scopo di promuovere l'uso appropriato degli antimicrobici e che indirizzano nella scelta ottimale del farmaco**, della dose, della durata della terapia e della via di somministrazione.
- Una gestione coordinata e multidisciplinare della terapia antimicrobica è ormai indispensabile nella cura delle infezioni, sia per raggiungere risultati clinici ottimali, sia per ridurre al minimo la tossicità e i potenziali eventi avversi correlati ai farmaci, i costi sanitari, la durata della degenza e per limitare la selezione di ceppi resistenti agli antimicrobici.

● **Stewardship**

- **È un modello organizzativo** in cui il livello superiore non solo svolge un ruolo di indirizzo e coordinamento, ma anche di interlocutore per la **promozione di un'azione collettiva, cooperativa, di crescita comune, di lavoro in comune, di partecipazione delle conoscenze.**

● **Antimicrobial Stewardship in medicina veterinaria**

- Programma o serie di interventi diretti al monitoraggio e all'orientamento dell'utilizzo degli antimicrobici negli animali, attraverso un approccio standardizzato **che sia supportato dall'evidenza**, al fine di ottenere **un uso giudizioso o appropriato di tali farmaci**.

● **Appropriatezza in terapia**

- *“il grado con cui una terapia è efficace, mirata, non eccessiva ed adeguata per rispondere ai bisogni cercando nel contempo di ridurre al massimo lo sviluppo di antibiotico resistenza”.*

● **Ma, cosa accade nel settore zootecnico...**



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



● **Infatti ... le norme sono ben focalizzati sul settore ... Reg 2019/6**

**European law on veterinary medicines:
what's new?**

Veterinary prescriptions can only be issued by veterinary surgeons (exceptions apply). The prescription will be valid throughout the EU. The quantity prescribed should be limited to the treatment.

Reg. 2019/6 Art. 105

All prescriptions require justification, such as a clinical diagnosis or proven knowledge of the animal.

www.fve.org

The EU has officially adopted new legislation on veterinary medicines*. It will be applicable in all EU countries from 28 January 2022.



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



● **Reg 2019/6**

- **Importanti doveri e responsabilità, sono definite lungo il percorso dal prescrittore al controllore.**



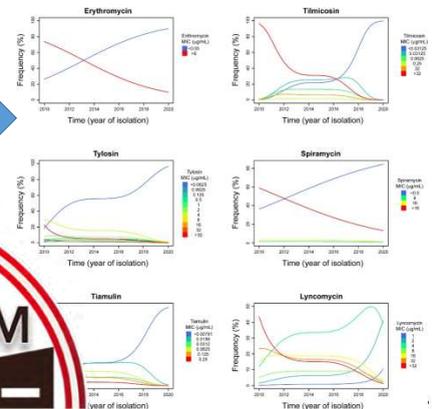
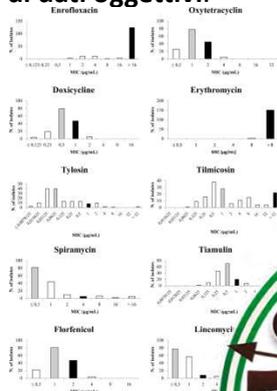
● **Tutte queste attività sono....**

- **Incluse all'interno di un processo diagnostico dove l'appropriatezza è alla base delle nostre decisioni**



● In particolare, il dato MIC organizzato ci permette...

- osservare potenziali cambiamenti nella popolazione patogena, consentendo ai professionisti di valutare la terapia appropriata sulla base di dati oggettivi.



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



Catania et al., 2019



● In particolare, il dato MIC organizzato ci permette...

- osservare potenziali cambiamenti nella popolazione patogena, consentendo ai professionisti di valutare la terapia appropriata sulla base di dati oggettivi.
- Lavoriamo per utilizzare tutti i dati prodotti a fini diagnostici per creare una piattaforma accessibile sia ai veterinari ufficiali che ai veterinari di allevamento.



● Storia del progetto ed evoluzione

- Esigenza di una maggiore omogeneità decisionale tra sale necroscopiche
- Specifici protocolli facilmente disponibili e implementabili con **sistema di monitoraggio delle analisi**

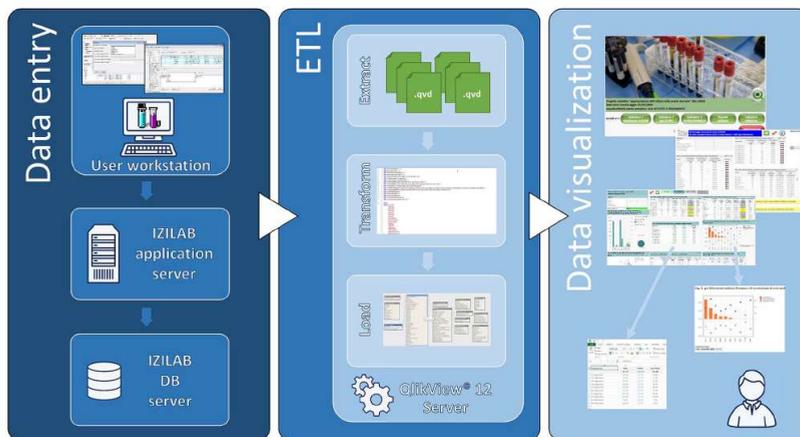


Figure 3. Architecture of the analytical platform and dataflow. Data are entered into the IZILAB LIMS at the user workstation and transferred to the IZILAB DB server through the IZILAB application server. Via the QlikView 12 server, data are selected and extracted, transformed, and then loaded (ETL) into the front-end tool Qlik View. On this level, summary dashboards with drill-down capabilities are generated. Tables and graphs can be exported with a click into text, Excel, or graphics.

Business intelligence tools to optimize the appropriateness of the diagnostic process for clinical and epidemiologic purposes in a multicenter veterinary pathology service

Nicola Pozzato,¹ Laura D'Este,² Laura Gagliazzo,³ Marta Vascellari,⁴ Monia Cocchi, Fabrizio Agnoletti, Luca Bano, Antonio Barberio, Debora Dellamaria, Federica Gobbo, Eliana Schiavon, Alexander Tavella, Karin Trevisiol, Laura Viel, Denis Vio, Salvatore Catania, Gaddo Vicenzoni

Abstract. Laboratory tests provide essential support to the veterinary practitioner, and their use has grown exponentially. This growth is the result of several factors, such as the eradication of historical diseases, the occurrence of multifactorial diseases, and the obligation to control endemic and epidemic diseases. However, the introduction of novel techniques is counterbalanced by economic constraints, and the establishment of evidence- and consensus-based guidelines is essential to support the pathologist. Therefore, we developed standardized protocols, categorized by species, type of production, age, and syndrome at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), a multicenter institution for animal health and food safety. We have 72 protocols in use for livestock, poultry, and pets, categorized as, for example, "bovine enteric calf", "rabbit respiratory", "broiler articular". Each protocol consists of a panel of tests, divided into "mandatory" and "ancillary", to be selected by the pathologist in order to reach the final diagnosis. After autopsy, the case is categorized into a specific syndrome, subsequently referred to as a syndrome-specific panel of analyses. The activity of the laboratories is monitored through a web-based dynamic reporting system developed using a business intelligence product (QlikView) connected to the laboratory information management system (IZILAB). On a daily basis, reports become available at general, laboratory, and case levels, and are updated as needed. The reporting system highlights epidemiologic variations in the field and allows verification of compliance with the protocols within the organization. The diagnostic protocols are revised annually to increase system efficiency and to address stakeholder requests.

Key words: appropriateness; business intelligence; dashboard; diagnosis; pathology.

Due Ricerche Correnti

- IZS UM 10/20 RC. «Diagnostica 2.0: strumenti informatici a supporto della diagnosi in sanità animale. Una possibile certificazione del percorso. Il sistema Dia-Pacemaker per la veterinaria del futuro.»
- IZS VE 03/22 RC. «Diagnostica 2.0: strumenti informatici a supporto della diagnosi in sanità animale. Validazione del sistema Dia-Pacemaker per la diagnosi delle forme respiratorie del suino (Porcine Respiratory Disease Complex) (PRDC).»



Comitato di Appropriatezza Diagnostica

Siamo lieti di annunciarvi che è stato istituito il nuovo
Comitato "Appropriatezza Diagnostica In Sanità Animale",
coordinato dal Dott. Salvatore Catania.

I componenti:

- Simona Zoppi IZSPLV
- Davide Pintus IZS Sardegna
- Domenico Galante IZSPB
- Leonardo Marino IZSPB
- Giovanni Cassata IZS Sicilia
- Marta Paniccia & Nicoletta D'Avino IZSUM
- Antonio Barberio IZSve
- Esterina De Carlo & Domenico Vecchio IZS Mezzogiorno
- Grazia Greco UNIBA
- Antonino Barone & Andrea Caprioli IZSLT
- Antonio Petriani IZSAM
- Antonio Maisano & Andrea Luppi IZSLER
- Loris Alborali ClassyFarm

● Obiettivi

-Come primi obbiettivi del gruppo che siamo qui a proporre potremmo immaginare la **Definizione di PDA** in caso di specifiche forme sintomatiche o sindromiche nelle specie zootecniche di nostro interesse con focus specifico per le **malattie infettive elencate** (Reg 429/2016, Reg 1882/2018, DL 136/2022) finalizzato ad avere una **maggiore uniformità del dato proveniente dal monitoraggio passivo, visto che sono proprio le diagnostiche territoriali attraverso il loro continuo ed incessante lavoro diagnostica su carcasse, ad instradare il percorso diagnostico e quindi svolgere il loro ruolo di osservatorio epidemiologico privilegiato.**

● Ad oggi

- Consolidamento delle rete tra le diagnostiche
 - Creazione di un network (ora so a chi chiamare nel caso di problemi su ...)
 - Conoscenza di nuovi modi di procedere conseguente rivalutazione del proprio con miglioramento del processo
 - Revisione dei percorsi diagnostici attraverso una revisione critica e costruttiva
-
- [PDA Aborti Ovicaprini e Bovini/Bufalini](#)
 - PDA forme enteriche neonatali dei Bovini/Bufalini

● Progetto Ricerca Strategica Ministeriale



IZSV\1\0011335\05-11-2024\Protocollo Generale (P.A2) Pagina 1 di 2


Ministero della Salute
DIPARTIMENTO DELLA SALUTE UMANA DELLA
SALUTE ANIMALE E DELL'ZOOINTEGRAZIONE E DEI RAPPORTI INTERNAZIONALI
DIREZIONE GENERALE DELLA SALUTE ANIMALE
135697
Piazzale G. Galvani, 3 - 00144 Roma
Rea@DGS.MINISALTE.IT

002943-04/11/2024 DGSF#DSF
Trasmissione elettronica
Prot. DGSF in DOCSPA / PEC

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Venezia
Dr.ssa Antonia Ricci
izsv.venezie@izsv.it

E.p.c. Direzione Generale della Salute Animale
Ufficio 1
Dott.ssa Marina Bellucci
SEDE

OGGETTO: IZS Venezia - Approvazione Progetto Strategico RC 2024.
Inizio lavori e CUP.

Si comunica che il progetto dal titolo "Adeguamento Diagnostico in Sanità Animale: armonizzazione e sviluppo di Percorsi Diagnostici appropriati per le malattie infettive di interesse sanitario nella rete IZZSS" (Responsabile scientifico Dr. Salvatore Catania) inviato con nota Prot. 10876 del 24/10/2024, risulta conforme alla linea di ricerca strategica valida per l'annualità di Ricerca Corrente II.ZZ.SS. 2024 secondo quanto indicato nella nota Prot. 30381 del 14/10/2024.

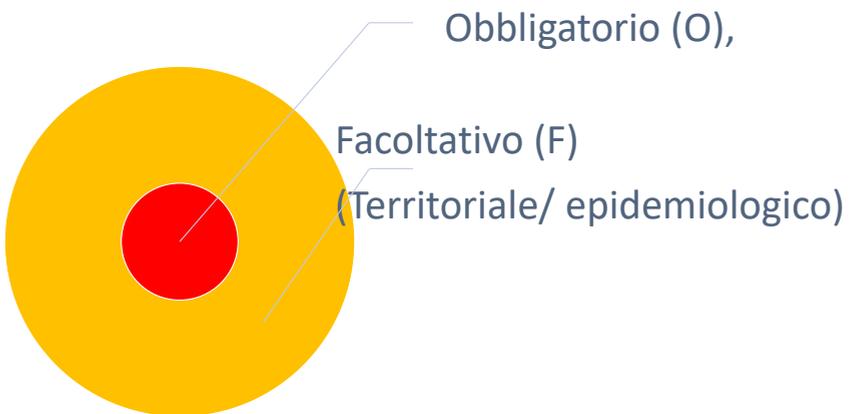
● **Livello d'interesse specifico**

A,B,C,D,E=1882/2018;

Z=zoonosico;

I=interesse zootecnico

● **GERARCHIA**





STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



55



STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA

STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA

Codice Allevamento
 Selezioni multiple

Specie
 Tutte

Anno
 Tutte

Regione
 ASL

Patogeno
 Tutte

Patologia
 Tutte

Riepilogo Allevamenti selezionati

Istituto	Allevamento	Specie	Regione	ASL
IZSLER		0122	Lombardia	C326

Numero conferimenti

21

Numero campioni

69

Generale Patogeno Patologia Sensibilità PA



Sensibilità Principio Attivo

ID Campione	Amminociclina	Amoxicillina/AcidoClavulamico	Ampicillina	Cefazolina	Clindamicina	Flofenicolo	Gentamicina	Kanamicina	Quacilina	Penicillina	Rifampicina	Sulfosozavolo	Tetraciclina	Trimetoprim + sulfonamidi
2024-06-20_191190_1_1_GEN_191910000000	Q-1	Q-9	Q-4	R	Q-1	R	Q-1	R	R	R	R	N/A	R	R
2023-09-31_209103_1_1_GEN_191910000000	Q-1	Q-4	Q-2	R	Q-1	R	Q-1	R	R	R	R	N/A	R	R
2023-08-07_1791704_1_1_GEN_191910000000	R	R	R	R	R	R	R	R	Q-8	R	Q-1	N/A	Q-2	Q-4
2022-09-14_207915_1_1_GOU_191910000000	Q-2	Q-3	Q-2	R	R	Q-9	Q-9	R	R	R	R	R	Q-2	R

Classificazione Conferimenti

Fonte	N.Conf.	Anno	Patogeno	Igizzazione	Sensipg	Quantificatore	Allev.	Specie	Materiale	ID Fiscale	N. Campioni	Patologia	Data	Proprietario	Veterinario
IZSLER	49758	2021	E. Coli ESBL	N				SUINO	CARCASSA	01911570982	1	Enterica	2021-02-10		
IZSLER	49758	2021	E. Coli spp.	N				SUINO	CARCASSA	01911570982	1	Enterica	2021-02-10		
IZSLER	87789	2021	Streptococcus spp.					SUINO	CARCASSA	01911570982	3	Setticemica	2021-03-11		
IZSLER	87795	2021	PRRS europeo					SUINO	CARCASSA	01911570982	2	Respiratoria	2021-03-11		
IZSLER	87795	2021	Streptococcus spp.					SUINO	CARCASSA	01911570982	2	Setticemica	2021-03-11		



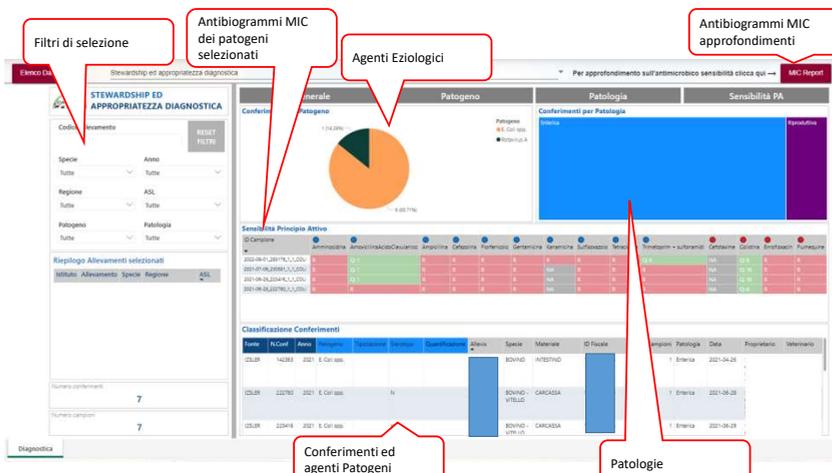
Salvatore Catania, 6 giugno 2025



56



STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA

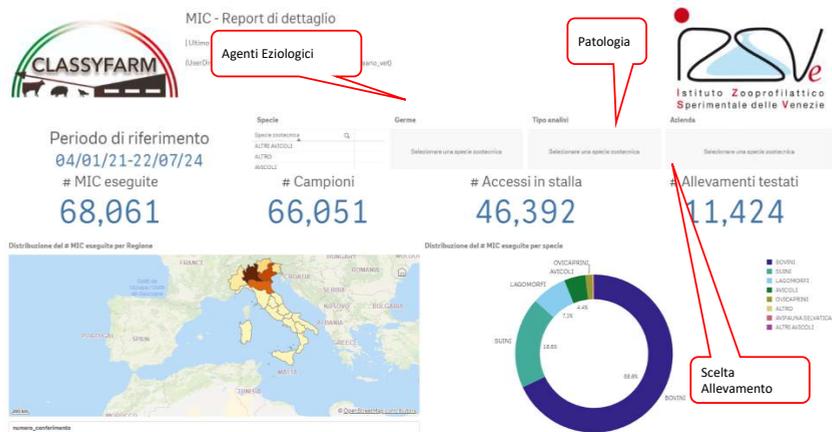


Salvatore Catania, 6 giugno 2025



57

STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



58

STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA



MIC - Report di dettaglio

Sindrome respiratoria: *Mannheimia haemolytica*



Periodo di riferimento
25/06/21-17/07/24

Specie	Genere	Tipo analisi	Azienda
Bovine	MANNHEIMIA HAEMOLYTICA	MIC RESPIRATORIO DA MIC	00120000 00120010 00120012 00120013

MIC eseguite

1,608

Campioni

1,608

Accessi in stalla

1,598

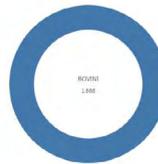
Allevamenti testati

1,057

Distribuzione dei # MIC eseguite per Regione



Distribuzione dei # MIC eseguite per specie



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



59



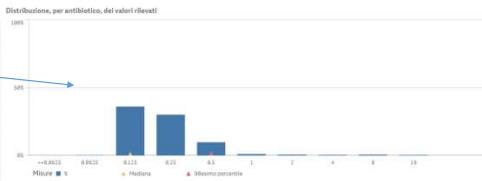
STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA

CIA / Non CIA

Sindrome respiratoria: *Mannheimia haemolytica*

Distribuzione per specie

Principio attivo	# Campioni	# Sensibili	%
AMOXICILLINA/ACIDOCLOXACILLO/AVILAZOLO	1.500	1.350	90,0%
AMOXICILLINA	1.000	1.000	100,0%
FLUMENICILLO	1.000	1.000	100,0%
GARTEMICINA	1.000	1.000	100,0%
KANAMICINA	1.000	1.000	100,0%
SPECTROMICINA	1.000	1.000	100,0%
TETRAACILINA	1.000	1.000	100,0%
TIAMOLINA	200	0	0,0%
TILDEPRIDINA	1.000	1.000	100,0%
TROMETOPRIMA/SULFAMETOXAZOLO	1.000	1.000	100,0%
TULATROMICINA	1.000	1.000	100,0%



Percentuali di Sensibilità

Distribuzione dei valori di MIC e MIC 90

Non CIA

Principio attivo	# Campioni	# Sensibili	%
Ceftiofur	1.000	1.000	100,0%
Clampocillina	1.000	1.000	100,0%
Flumenicillo	1.000	1.000	100,0%

CIA / Non CIA



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



60



STEWARDSHIP ED APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA

Il BMQ esprime il rapporto tra il valore del BP (Breakpoint) di sensibilità utilizzato per l'interpretazione e il valore di MIC rilevato. Questo dato normalizza i risultati e rende comparabili l'attività antibiotica delle varie metodologie scegliendo quindi una maggiore e rapida interpretazione del valore MIC. Per ulteriori dettagli si consiglia il file guida mic.pdf (Eszenreiter, I)

Per vedere la distribuzione dei BMQ, clicca qui

Quoziente e numero di campioni risultati sensibili ai farmaci nei confronti dei ceppi testati

Principio attivo	CL	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	# Campioni	# Sensibili	% Sensibili
AMOXICILINA-ACIDO CLAVULANICO		455	598	197	0	0	0	0	0	0	0	1.000	1.350	85,50%
AMPLICILINA		138	37	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	217	15,94%
CEFOTIFUR		18	12	38	48	88	1.000	0	0	0	0	1.000	1.583	63,37%
ENOXACILINA		164	44	213	228	0	0	0	0	0	0	1.500	1.114	74,27%
FLUORANICILINA		107	100	283	181	0	0	0	0	0	0	1.000	1.400	70,00%
ALUMINOCINA		214	1.115	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	1.285	79,25%
GAMETRONICINA		24	1.215	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	1.314	84,20%
MINOXICINA		3.214	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000	1.281	77,50%
SPECTROMICINA		0	181	53	82	0	0	1	0	0	0	1.000	1.395	67,90%
TETRAZOLINA		41	103	489	68	84	0	0	0	0	0	1.000	1.234	79,74%
TAMOXINA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	977	0	0,00%
FLDIPRODINA		138	1.281	2	0	0	2	0	0	0	0	1.001	1.381	67,93%
TRIMETHOPRIM-SSULFAMETOXAZOLO		89	74	44	84	1.788	0	0	0	0	0	1.000	1.330	66,50%
TULATROMICINA		1.215	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1.000	1.331	66,55%



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



61



CLASSYFARM

DIAGNOSTICA & AMS

VALUTAZIONI SUL CAMPO (VET)



LIBERO PROFESSIONISTA



UFFICIALE



CERTIFICATORE

ALLEVAMENTI: BENESSERE, BIOSICUREZZA, AMS



DISPONIBILE PER TUTTI

MACELLO



SOLO UNA SELEZIONE



RICETTA ELETTRONICA VETERINARIA



DB NATIONALE VET

ALTRI DBS



CLASSYFARM APP



CLASSYFARM DB

CATEGORIZZAZIONE IN BASE AL RISCHIO



SORVEGLIANZA



STEWARDSHIP



Salvatore Catania, 6 giugno 2025



62



● Prospettive future....

- Evoluzione in un sistema che può dare una attraverso l'analisi dei dati raccolti,
 - Valutazioni utili a migliorare l'operato dei patologi attraverso la costante implementazione dei protocolli sulla base dei dati annuali
 - Sistemi di reportistica delle problematiche rilevate classificate per forme di *défaillance* organica (Problematica respiratoria; Problematica enterica etc., etc.
 - Struttura portante per l'implementazione della «qualità» in diagnostica necroscopica, con importanti ripercussioni nel processo di miglioramento continuo
- **Armonizzazione e comparabilità dei dati prodotti...**

● In conclusione il sistema **Appropriatezza Diagnostica**



● Take home message

- L'appropriatezza diagnostica **non può sostituire l'esperienza, la conoscenza e le abilità del professionista**, ma di sicuro **può organizzarla, ampliarla e completarla**.
- La **nuova sfida** per i **Laboratori in Medicina Veterinaria** sarà quella di cogliere il meglio dall'integrazione dei sistemi BI per permetterci di **comprendere** meglio e quindi contribuire a **gestire** tutte quelle **complesse problematiche tipiche delle moderne malattie dei sistemi industrializzati**
- **Saper utilizzare al meglio le risorse disponibili per svolgere il proprio compito producendo dati armonizzati**



ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO INTERNAZIONALE DELLE VENEZIE
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DELLA LIGURIA, EMILIA E ROMAGNA
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DELLA MARCHE E DELL'EMILIA ROMAGNA
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DEL LAZIO E DELL'ABRUZZO
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DEL MEZZOGIORNO
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DELLA BASILICATA
 ISTITUTO ZOOEPIDEMIOLOGICO REGIONALE DELLA SICILIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia
 Ministero della Sanità

Salvatore Catania, 6 giugno 2025

67

In the **long history** of humankind
 (and **animal** kind, too)
those who learned to collaborate
and improvise most effectively
have prevailed.
 (Charles Darwin)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia
 Ministero della Sanità

Salvatore Catania, 6 giugno 2025

68



Esperienza di campo nella riduzione dell'utilizzo del farmaco in Francia

CHIMIENTI Claudio, DMV

6 giugno 2025 – Convenio SIPA Bologna



1.a) Speakers



DMV CHIMIENTI
Claudio

- Veterinario avicola in Bretagna
- **Consulente** per varie ditte di Farmacia e Genetica avicole (Cargill, CEVA, ECO, Novogen, Novus, Timab, Zoetis)
- **Competenza mondiale** maturata in molti anni di attività nel settore avicolo, dalla fattoria alla tavola
- **Formatore certificato** in animal welfare, biosicurezza e sicurezza alimentare

- ▶ Introduzione
 - ▶ Situazione produttiva in Francia
 - ▶ Situazione veterinaria avicola in Francia
- ▶ EcoAntibio
 - ▶ Obiettivi e risultati
- ▶ Alterbiotique e altre alternative
- ▶ Chiusura

EU production of poultry

Source : Eurostat, forecast 2024 by MS

	2022	2023	%2023/2022	trend 2024/2023
PL	2,729,890	2,746,040	0.6	0
ES	1,638,640	1,718,430	4.9	0
DE	1,543,000	1,563,000	1.3	0
FR	1,503,580	1,533,410	2.0	0
IT	1,213,160	1,334,140	10.8	0
NL	863,970	849,620	-1.7	0
HU	479,880	514,810	7.3	0
RO	491,220	510,690	4.0	0
BE	449,040	428,200	-4.6	0
PT	370,980	380,740	2.6	0
EL	248,770	273,890	10.1	0
SE	176,120	175,860	-0.1	0
CZ	169,970	167,690	-1.3	0
IE	170,940	167,650	-1.9	0
DK	151,920	159,200	4.8	0
AT	143,580	150,470	4.8	0
FI	147,130	143,580	-2.4	0
BG	119,530	120,890	1.1	0
LT	86,280	85,950	-0.4	0
SK	77,370	77,360	-0.0	0
SI	73,660	75,250	2.2	0
HR	71,620	72,090	0.7	0
LV	36,600	37,080	1.3	0
CY	27,260	27,770	1.9	0
MT	4,250	4,740	11.5	0
EE	0	0		
EU27	12,988,360	13,318,550	2.5	0

+5%+	0
0%+	0
0%	0
-5%+	0
-5%	0

LAYING HENS

Number of laying hens by farming method (maximum capacity) according to notifications under Commission Implementing Regulation (EU) 2017/1185, Art. 12(b) - Annex III.9

Member State (MS)	2024		% by farming method in respective country			
	Total laying hens in MS	% MS / EU	% enriched	% barn	% free range	% organic
FR***	58,471,300	14.9%	30.1%	24.2%	32.3%	13.4%
DE	58,350,494	14.9%	3.7%	53.8%	28.8%	13.8%
PL	52,887,144	13.5%	67.7%	23.8%	7.1%	1.4%
ES	47,855,447	12.2%	64.0%	24.1%	10.3%	1.5%
NL***	43,279,344	11.0%	34.0%	56.3%	4.9%	4.8%
IT***	29,926,930	7.8%	14.8%	33.1%	16.1%	6.0%
BE	11,244,966	2.9%	34.0%	45.8%	13.5%	6.8%
RO	10,119,704	2.6%	48.4%	45.5%	3.3%	2.8%
PT	8,938,930	2.3%	67.1%	25.7%	6.0%	1.2%
SE**	8,323,583	2.1%	2.7%	78.2%	7.4%	11.7%
CZ	7,513,027	1.9%	50.9%	46.9%	1.7%	0.5%
AT	7,440,366	1.9%	0.0%	56.1%	31.1%	12.9%
HU	8,012,167	2.0%	67.6%	30.8%	1.2%	0.3%
FI	5,920,354	1.5%	24.1%	67.9%	3.7%	4.3%
BG	5,258,504	1.3%	69.2%	5.8%	26.0%	0.0%
EL*	4,649,599	1.2%	76.5%	12.4%	5.5%	5.6%
DK	4,671,738	1.2%	10.2%	54.1%	8.2%	27.6%
IE	3,952,064	1.0%	31.6%	19.7%	45.3%	3.4%
LV***	3,568,355	0.9%	68.6%	27.2%	4.0%	0.2%
LT	3,427,926	0.9%	76.6%	21.9%	1.3%	0.2%
SK	2,787,846	0.7%	62.1%	30.5%	7.1%	0.3%
HR	2,401,327	0.6%	44.4%	48.6%	6.2%	0.8%
SI	1,557,777	0.4%	14.3%	79.2%	4.1%	2.4%
EE	968,992	0.2%	78.7%	9.1%	6.8%	5.5%
CY	510,268	0.1%	63.1%	18.3%	15.5%	3.0%
MT**	364,624	0.1%	97.2%	2.8%	0.0%	0.0%
LU	153,355	0.0%	0.0%	67.0%	16.9%	26.1%
TOTAL	392,666,140	100%	38.0%	39.6%	16.7%	6.8%

DG AGRI E3
22 May 2025

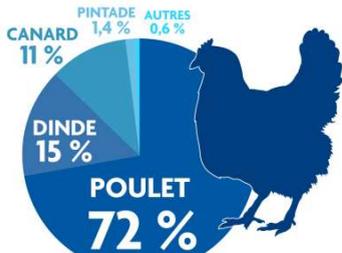
* - 2020 data ** - 2022 data *** - 2023 data

1) Francia

Aviculture da carne

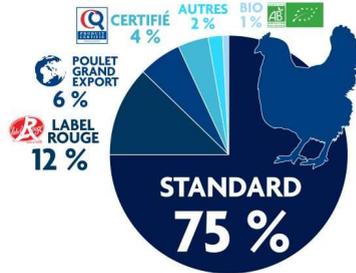
STABILITÉ DU PLEIN AIR
EN 2024

RÉPARTITION DE LA PRODUCTION
DE VOLAILLES PAR ESPÈCE EN 2024



Source : ITAVI d'après Agreste / eADOCOM-EP

ANVOL

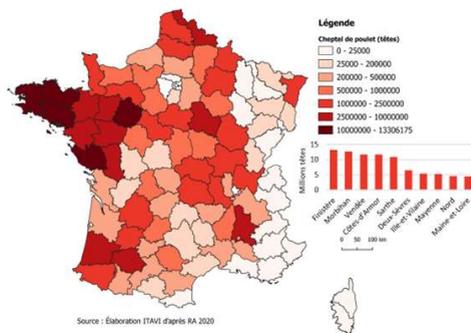
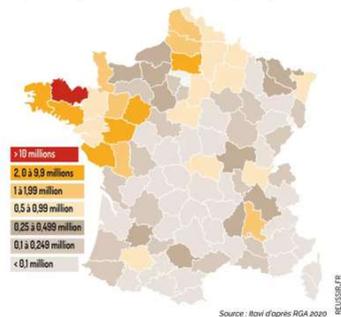


Source : ITAVI d'après Agreste / eADOCOM-EP

ANVOL

Avicoltura in Francia: ovaiole & broilers

Répartition départementales des effectifs de poules pondeuses



7

Attività broiler

- ▶ Integrazione Parziale
 - ▶ Sistema basato su un contratto MPA
- ▶ Mercato multi-attore e multi-specie
 - ▶ Breeders / broilers
 - ▶ Mangime
 - ▶ Organizzazioni di produzione (private o cooperative)
 - ▶ Mattatoi

Attività ovaiole

- ▶ + diversità di contratti
 - ▶ Integrazione totale / Integrazione Parziale / libero

8

Situazione

- Due grandi gruppi privati (>75 % del mercato)
 - Reseau Cristal (37 strutture, 88 siti di esercizio, > 300 vet)
 - Chene Vert Conseil
- Gruppi veterinari legati a cooperative
 - Sanders / Cooperl / Gouessant
- Piccole strutture indipendenti

Venta di servizi

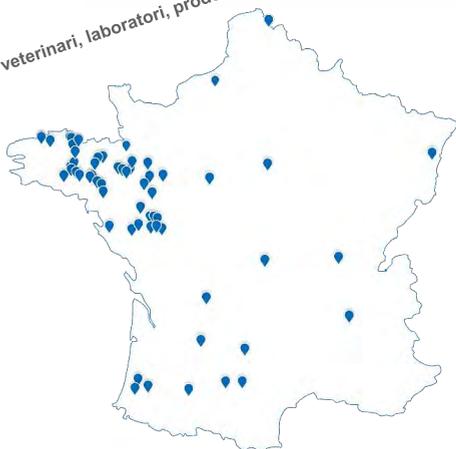
- Visite
- Formazione
- Analisi

Venta di farmaci

- Preventivi
- Curativi

www.groupecristal.fr

Servizi veterinari, laboratori, prodotti per la cura degli animali



Più di 350 veterinari indipendenti per il bestiame

www.reseaucristal.fr

- ▶ Laboratori in sanità animale
 - ▶ Laboratori ufficiali pubblici:
 - ▶ LNR = Laboratoire National reference
 - ▶ Laboratoire d'analyses agréées → 1 per provincia
 - ▶ Laboratori accreditati private (soprattutto RC + CVC)
 - ▶ COFRAC (ISO 17025)
 - ▶ Salmonella / AHP
 - ▶ Serologie
 - ▶ PCR / NGS / IR
 - ▶ Laboratori di prossimità
 - ▶ Cultura ++ dell'autopsia e della batteriologia

- ▶ EcoAntiBio1 2011 - 2016
 - ▶ Obiettivi
 - ▶ Uso Antibiotici → -25%
 - ▶ Giustificazione di ogni uso di antibiotico con diagnostico, durata e posologia preciso
 - ▶ Prezzo unico per gli AB
 - ▶ Divieto di ogni tipo di sconto, promozione o incitazione economica
 - ▶ Regole severe di prescrizioni e consegna di AB critici (FQ e C3/C4)
 - ▶ Sensibilizzazione e formazione all'antibioresistenza
 - ▶ Stimolazione allo sviluppo di alternative
 - ▶ Sviluppo di strumenti di monitoraggio
 - ▶ Delle vendite e uso di antibiotici
 - ▶ Dell'evoluzione delle resistenze



* Résultats 2016 par rapport à 2011 pour un objectif initial de -25% en 5 ans (toutes familles d'antibiotiques et toutes espèces animales)
** Résultats 2016 par rapport à 2013 pour un objectif initial de -25% en 3 ans fixé par la loi d'avenir pour l'agriculture.

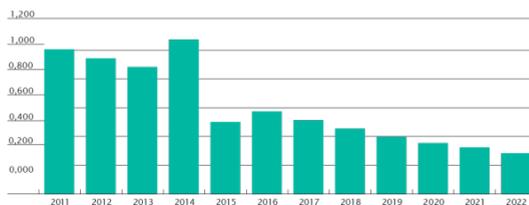
Sol
utio
n
Alt
erbi
otiq
—ue—

- ▶ Ecoantibio 2 2017 – 2021
 - ▶ Obiettivo → Consolidare EcoAntibio 1
 - ▶ Riduzione uso AB -30% & -50% AB Crit vs 2014
 - ▶ Integrazione ONE HEALTH
 - ▶ Rinforzo della prevenzione
 - ▶ Biosecurity / Vaccinazione / Genetica / Condizioni di allevamento
 - ▶ Sviluppo di referenti in antibiototerapia
 - ▶ Sviluppo di ICAV (indicatore di consume antibiotic veterinary)
 - ▶ R&D bandi a progetti : patologia ad alto uso AB
- ▶ Ecoantibio3 2023 – 2028
 - ▶ Dichiarazioni di vendita AB (CALYPSOVET)

▶ Successi in avicoltura

- ▶ Riduzione dell'uso AB del 72% tra 2011 e 2022 (ANVOL)
- ▶ Riduzione AB critici del 90% tra 2011 e 2023 (Chaire BEA VetAgro Sup)

Figure 3. Exposition des volailles aux antibiotiques entre 2011 et 2022 (indicateur ALEA)



▶ EC 2019/6 on veterinary medicinal products and repealing Directive

▶ Article 107

▶ Use of antimicrobial medicinal products

- ▶ 1. Antimicrobial medicinal products shall not be applied routinely nor used to compensate for poor hygiene, inadequate animal husbandry or lack of care or to compensate for poor farm management.
- ▶ 2. Antimicrobial medicinal products shall not be used in animals for the purpose of promoting growth nor to increase yield.
- ▶ 3. Antimicrobial medicinal products shall not be used for prophylaxis other than in exceptional cases, for the administration to an individual animal or a restricted number of animals when the risk of an infection or of an infectious disease is very high and the consequences are likely to be severe.
- ▶ In such cases, the use of antibiotic medicinal products for prophylaxis shall be limited to the administration to an individual animal only, under the conditions laid down in the first subparagraph.
- ▶ 4. Antimicrobial medicinal products shall be used for metaphylaxis only when the risk of spread of an infection or of an infectious disease in the group of animals is high and where no other appropriate alternatives are available. Member States may provide guidance regarding such other appropriate alternatives and shall actively support the development and application of guidelines which promote the understanding of risk factors associated with metaphylaxis and include criteria for its initiation.

2) In pratica

Concretamente

- Formazione Biosecurity obbligatoria dal 2016 per allevatori
 - Relazione AIHP ma pure AB / one Health
- Uso generalizzato del laboratorio - uso ragionato AB
 - Autopsia (3h)
 - Batteriologia (12 à 72h)
 - ABG (+24 a 48h)

Labo	Dossier	Bact	ABG	R ENR	E Col
Res AD	7206	21327	5887 (81,69%)	269 (4,57%)	144 (2,45%)
LB2A	651	497	370 (56,83%)		
RBO	807		1428		32 (2,24%)

Incremento uso vaccini

Sviluppo uso vaccinale

- Virale
 - Hatchery (++)
 - Fattoria (Booster)
- Batterico
 - Commerciale
 - E.Coli (++)
 - MS – MG (-)
 - Autogeno
 - Ovaiole & Breeders (<90%): E.Coli / Past / Camp Hepaticus
 - Tacchini (tra 30 e 70%) : ORT



- ▶ **Uso fitoterapia e olii essenziali**
 - ▶ Phytoqramme per conferma attività
 - ▶ In sostituzione o attesa di un antibiogramma
- ▶ **Uso di biocidi**
 - ▶ Esterni o DW
- ▶ **Qualità dell'acqua**
 - ▶ Qualità microbiologica
 - ▶ Acidificazione
- ▶ **Sviluppo d'uso di flora competitive**
 - ▶ A D1
 - ▶ Durante le fasi critiche



- ▶ **Richiesta di prodotti garantite senza antibiotici**
 - ▶ Equilibrio tra le perdite economiche e il rispetto del animal welfare
 - ▶ Pressione tra «allevatore/tecnico dell'integrazione/mattatoio/veterinario» ad ogni patologia/uso di antibiotici
- ▶ **Alternative (Alterbiotique) non è solo solstituire un AB con un altro prodotto**
- ▶ **Modificazione del business model veterinario avicola**
 - ▶ Trasferimento da "vendita di prodotti" a "onorari"
 - ▶ Costi analitica ben accettati
 - ▶ Difficoltà a fatturare il «cervello»
 - ▶ Uscita da un mercato regolamentato a un mercato libero (dal farmaco all'alternativo)
 - ▶ Divieto di agevolazione economiche su AB
 - ▶ Prezzo unico

- ▶ Senza soluzione preventive o alternative efficienti → principali usi attuali AB
 - ▶ *Brachyspira Pilosicoli* → macrolide in produzione (tiamulina o TC)
 - ▶ Analisi PCR
 - ▶ *Enterococcus caecorum* → LS in metafilassi dopo lotto N-1 con problemi
 - ▶ Autopsie
 - ▶ Enterite necrotiche → amoxy
 - ▶ Autopsie
 - ▶ Botulismo → amoxy
 - ▶ Autopsie + PCR
 - ▶ *Colibacillosi in pulcini* → TMPS
 - ▶ Autopsie + batteriologia

- ▶ I vari EcoAntiBio hanno permesso di ridurre in modo +++ l'uso d'AB
- ▶ Iniziative commerciali (prodotto senza uso di antibiotico) mostrano i loro limite e contraddizioni
 - ▶ Mortalità / Welfare vs Uso antibiotico
 - ▶ Liste specifiche clienti finale vs risultati ABG
- ▶ Le campagne umane – One Health impattano l'opinione
 - ▶ “Les antibiotiques, ce n'est pas automatique”
- ▶ Rilascio delle attese ABF legate a crisi economiche attuali
 - ▶ Covid / AIHP / Ucraina
- ▶ L'AB è e sarà un farmaco necessario al veterinario avicola
 - ▶ A noi di usarlo bene per conservarlo

DALL'ALLEVAMENTO AL CLOUD: COME I BIG DATA RIVOLUZIONANO L'AVICOLTURA

Franzo G.

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

Abstract

Nei prossimi decenni, la domanda di carne di pollame e uova è destinata ad aumentare significativamente, seguendo la crescita della popolazione umana. Sebbene ciò rappresenti una grande opportunità per il settore, pone anche sfide importanti: inquinamento, impoverimento del suolo, competizione per le risorse tra nutrizione umana e animale, benessere degli animali, restrizioni nell'uso di promotori della crescita e antibiotici, e il crescente rischio di malattie infettive e zoonosi. L'aumento della produzione avicola dovrà quindi basarsi sull'ottimizzazione e sull'incremento dell'efficienza, piuttosto che su un'espansione quantitativa non sostenibile.

In questo contesto, i big data offrono strumenti fondamentali per affrontare queste sfide. La possibilità di generare, archiviare, condividere e analizzare enormi volumi di dati tramite algoritmi automatici consente lo sviluppo di soluzioni avanzate per aumentare la redditività delle aziende agricole, ridurre l'impatto ambientale e migliorare la salute e il benessere animale e umano.

Il documento riassume l'applicazione di diverse tecnologie di sensori nella produzione avicola, tra cui sensori ottici, acustici, dispositivi indossabili, termografia a infrarossi e analisi del flusso ottico. Questi strumenti permettono un monitoraggio costante e non invasivo degli animali, fornendo dati utili per la prevenzione precoce di problemi sanitari o gestionali.

Viene inoltre discussa l'utilità di tecniche statistiche avanzate, come il machine learning e il deep learning, nella costruzione di modelli predittivi e di classificazione, capaci di supportare decisioni rapide ed efficaci in ambito produttivo. Un ulteriore ambito analizzato, in grande espansione e di notevole importanza, è quello della genomica dei patogeni e dei loro ospiti, utile per tracciare l'epidemiologia, l'evoluzione e la diffusione degli agenti infettivi, oltre a valutare in modo oggettivo l'efficacia delle strategie di selezione e gestione degli animali.

Nonostante l'introduzione dell'intelligenza artificiale e dell'automazione possa generare timori e richieda nuove competenze per operatori e allevatori, i benefici ottenibili superano ampiamente le criticità. La crescente integrazione di tecnologie nei sistemi produttivi permetterà di affrontare più efficacemente le sfide sanitarie, economiche e ambientali dell'allevamento moderno.

In definitiva, la raccolta e l'analisi integrata di big data, unita a standard di raccolta e condivisione dei dati, e alle tecnologie di sequenziamento molecolare, potrà sostenere una produzione alimentare più sicura, efficiente e sostenibile, garantendo la tutela dell'ambiente, il benessere animale e la salute pubblica.

INTRODUZIONE

L'agricoltura riveste un ruolo fondamentale nell'economia globale, e la pressione su questo settore continuerà ad aumentare parallelamente alla crescita della popo-

lazione mondiale. Entro il 2050, si prevede che la domanda di carne di pollame raddoppierà, mentre quella di uova aumenterà del 40%, rappresentando una fonte importante di proteine economiche e di alta qualità. Oltre all'allevamento industriale, la produzione di pollame su piccola scala, soprattutto nei contesti rurali, può contribuire in modo significativo alla riduzione della povertà, fornendo reddito e sicurezza alimentare alle famiglie.

Tuttavia, questo incremento nella domanda pone anche sfide complesse: inquinamento, erosione del suolo, competizione tra alimentazione umana e animale, benessere degli animali, limitazioni all'uso di antibiotici e crescita del rischio di malattie infettive e zoonosi. Queste problematiche, reali o percepite, pongono limiti alla possibilità di espandere ulteriormente i modelli di allevamento tradizionali. Una delle risposte più efficaci consiste nel migliorare l'efficienza produttiva, sfruttando la raccolta, l'integrazione e l'analisi tempestiva di grandi quantità di dati. Il concetto di big data è spesso descritto tramite le "3 V": volume (quantità), velocità (rapidità di generazione) e varietà (diversità delle fonti e dei tipi di dati).

Tecnologie emergenti come i sensori, il cloud computing, il machine learning (ML) e l'intelligenza artificiale (AI) stanno trasformando numerosi settori, inclusa la zootecnia. Sebbene la raccolta dei dati sia già diffusa in molte realtà agricole, persiste un certo scetticismo, cui non fa eccezione l'ambito dell'avicoltura. Tuttavia, proprio per la sua struttura standardizzata e altamente integrata a livello globale, l'allevamento avicolo offre condizioni ideali per l'adozione di nuove tecnologie digitali.

Negli ultimi anni, molti allevatori hanno avuto accesso a tecnologie fino a poco tempo fa impensabili, come internet ad alta velocità, smartphone e sistemi di calcolo economici. Nonostante ciò, le strategie per l'integrazione e l'analisi dei big data sono ancora in fase embrionale. Sensori come telecamere, termocamere, microfoni, accelerometri, Radio-Frequency Identification (RFID) e altri strumenti possono generare enormi quantità di dati. Questi possono essere elaborati da algoritmi avanzati di AI e ML per rilevare, prevedere e segnalare eventi anomali in allevamento.

In questo testo, ci si concentrerà sulla raccolta e l'applicazione dei dati comportamentali e produttivi degli animali, nonché sui dati genetici dei microrganismi e dei loro ospiti, elementi fondamentali per l'innovazione sostenibile nel settore avicolo.

BIG DATA NELLA PRODUZIONE AVICOLA: APPLICAZIONI E GESTIONE DEI DATI

Nel contesto dell'espansione della produzione avicola, i big data stanno rivoluzionando la gestione degli allevamenti grazie alla raccolta e all'elaborazione automatica di grandi volumi di informazioni. L'agricoltura di precisione, e in particolare l'allevamento di precisione, utilizza sensori e tecnologie intelligenti per acquisire dati ambientali e comportamentali al fine di migliorare il benessere animale e l'efficienza produttiva. In allevamenti intensivi, variabili ambientali come temperatura, umidità, qualità della lettiera e concentrazione di gas sono fondamentali per prevenire situazioni di stress negli animali, migliorando la produttività e riducendo la mortalità.

Tecnologie come i sensori acustici permettono di monitorare vocalizzazioni anomale nei polli, rilevando i pattern di assunzione di alimento o condizioni ambientali non ottimali. Questi strumenti si sono dimostrati efficaci anche per l'identificazione precoce di infezioni, come quelle causate dal virus della bronchite infettiva o dell'influenza aviaria. Allo stesso modo, i sensori dell'aria possono rilevare composti

volatili correlati alla coccidiosi, permettendo interventi tempestivi.

Anche l'acquisizione automatica di immagini contribuisce alla sorveglianza del benessere animale: software come Eyanamic e tecniche di optical flow sono utilizzati per analizzare i movimenti dei polli e identificare problemi come zoppie o infezioni da *Campylobacter*. Le immagini termiche a infrarossi sono impiegate per monitorare la temperatura corporea e rilevare condizioni di stress termico o alterazioni fisiologiche, legata a patologie localizzate quali lesioni podali, o rialzi febbrili in caso di infezione. Tali tecnologie non invasive possono essere applicate su larga scala e rappresentano strumenti preziosi per la sicurezza alimentare e la salute pubblica. Inoltre, l'utilizzo di sensori di posizione e sistemi GPS consente di monitorare in tempo reale la movimentazione di oggetti, personale e mezzi sia all'interno che tra diversi allevamenti, migliorando la tracciabilità, la gestione logistica e l'applicazione delle misure di biosicurezza.

Per supportare questa mole di dati, è necessario disporre di infrastrutture adeguate alla loro gestione. L'Internet delle Cose (IoT) permette la connessione tra dispositivi intelligenti, consentendo l'automazione dei processi e facilitando il monitoraggio remoto. Tuttavia, i tradizionali modelli statistici sono spesso inadeguati per l'analisi di big data, ed è per questo che stanno prendendo piede tecniche di machine learning (ML) e deep learning (DL). Questi metodi, estremamente flessibili, permettono di includere una grande numero di variabili nei loro modelli, valutando pattern complessi e non lineari.

Nonostante la percezione di opacità di questi strumenti, la loro validazione empirica attraverso test su dati indipendenti garantisce un'elevata affidabilità. Questo approccio consente di trasformare i dati raccolti in sistemi di classificazione, predittivi delle dinamiche future e di allerta precoce per i produttori, migliorando la capacità di prevenzione delle malattie, riducendo i costi e aumentando la produttività. In sintesi, l'integrazione tra big data, AI e sensoristica offre nuove opportunità per una gestione più sostenibile, efficiente e attenta al benessere e alla salute animale*.

USO DEL SEQUENZIAMENTO IN AVICOLTURA

Negli ultimi anni, il sequenziamento genomico ha rivoluzionato l'approccio all'epidemiologia molecolare dei patogeni, fornendo strumenti potenti per comprendere in profondità le dinamiche di diffusione delle malattie infettive. Attraverso l'analisi dei genomi microbici, è oggi possibile identificare link epidemiologici tra focolai apparentemente indipendenti, ricostruendo la catena di trasmissione e individuando l'origine comune di un'infezione. Inoltre, confrontando le sequenze virali o batteriche prima e dopo l'adozione di specifiche misure di controllo, quali la vaccinazione, è possibile valutare l'efficacia degli interventi e monitorare l'eventuale insorgenza di varianti resistenti, adattative o in grado di evadere la risposta immunitaria.

L'uso del sequenziamento consente anche di identificare i determinanti genetici associati alla trasmissibilità, alla virulenza o alla resistenza antimicrobica e alla cross-protezione fra ceppi, fornendo dati essenziali per costruire modelli predittivi della diffusione e dell'evoluzione dei patogeni. In parallelo, le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) permettono di spingersi oltre i soli patogeni noti, aprendo la strada alla scoperta di nuovi microrganismi attraverso approcci metagenomici. In particolare, in presenza di sindromi infettive non spiegate da patogeni convenzionali, il sequenziamento diretto da cam-

pione clinico può rivelare nuovi agenti eziologici, espandendo le conoscenze in ambito diagnostico e patogenetico.

Un altro campo in rapida espansione è lo studio del microbioma, ovvero della comunità microbica che colonizza ospiti e ambienti. Tramite queste analisi, è possibile caratterizzare la composizione e le funzioni del microbioma, monitorarne le variazioni in relazione a condizioni patologiche, trattamenti, diete o fattori ambientali, e comprenderne il ruolo nella salute e nella malattia. Infine, il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) e del trascrittoma forniscono informazioni di altissimo dettaglio, fondamentali per studi di espressione genica e per comprendere la fisiologia dell'ospite e la sua risposta a diverse condizioni. Tecnologie più recenti, come il single-cell RNA sequencing, permettono addirittura di analizzare il profilo trascrizionale a livello di singola cellula, rivelando eterogeneità cellulari invisibili agli approcci tradizionali e offrendo una visione rivoluzionaria della biologia dei tessuti, delle infezioni e delle risposte immunitarie.

CRITICITÀ E SFIDE PER IL FUTURO

Nonostante i numerosi vantaggi offerti dall'analisi dei big data, dai sistemi integrati di sensori e dall'impiego di algoritmi di apprendimento automatico, permangono alcuni punti critici e sfide che non possono essere trascurati. Una delle principali problematiche riguarda la proprietà, l'uso e la privacy dei dati raccolti. Grandi quantità di informazioni generate da dispositivi e servizi tecnologici vengono archiviate su server remoti, spesso monetizzate da grandi aziende per scopi commerciali. Alcune multinazionali potrebbero vendere i dati raccolti dagli allevatori, generando tensioni tra questi ultimi e i fornitori di servizi, con il rischio di ostacolare o rallentare l'adozione delle tecnologie in ambito agricolo.

In parallelo, l'efficacia di queste tecnologie non è garantita ovunque e in qualsiasi condizione. Molti allevatori, soprattutto quelli attivi in contesti marginali o con risorse limitate, possono trovarsi impossibilitati ad accedere o adottare le innovazioni, a causa di barriere economiche, sociali o strutturali. Un aspetto importante e spesso trascurato riguarda infatti il potenziale impatto delle tecnologie digitali sull'equità sociale: è fondamentale evitare che queste innovazioni amplifichino ulteriormente le disuguaglianze già esistenti nel settore agricolo.

Un altro nodo critico è rappresentato dalla commercializzazione prematura di tecnologie non ancora validate adeguatamente. Diverse aziende vengono accusate di aver utilizzato gli allevatori come "tester", vendendo dispositivi o soluzioni in fase sperimentale, senza una reale dimostrazione di efficacia. Gli errori associati all'uso di tecnologie immature possono generare danni economici importanti e compromettere la fiducia degli operatori.

Particolarmente delicato è anche il tema della condivisione dei dati genomici e dei metadati associati alle malattie infettive. La maggior parte degli allevatori e delle aziende avicole è restia a diffondere tali informazioni, temendo ripercussioni legali o svantaggi competitivi. Anche le aziende farmaceutiche e i laboratori diagnostici, pur raccogliendo regolarmente dati, spesso non li condividono per mantenere un vantaggio strategico. Più preoccupante ancora è la mancata condivisione da parte di enti pubblici e centri di ricerca, i quali spesso trattengono i dati per difendere la propria priorità scientifica. Tuttavia, la disponibilità di sequenze e metadati di qualità è fondamentale per comprendere la diffusione delle malattie infettive, valutare l'efficacia

delle strategie di controllo e proteggere la salute pubblica. È pertanto auspicabile promuovere la condivisione dei dati attraverso sistemi che garantiscano l'anonimato, ma che allo stesso tempo forniscano report chiari e utili, capaci di restituire valore agli stessi allevatori e aziende che mettono a disposizione i propri dati. Solo attraverso una gestione trasparente e collaborativa delle informazioni si potrà garantire un reale beneficio collettivo per la salute animale, umana e ambientale.

CONCLUSIONI

Nonostante permangano ancora molte incognite, limiti e interrogativi aperti, la collaborazione tra intelligenza artificiale e operatori umani nel settore zootecnico, sebbene possa inizialmente suscitare timori e richieda un significativo adattamento da parte degli allevatori e del personale coinvolto, presenta vantaggi complessivi indiscutibili. Il timore è legato alla necessità di acquisire nuove competenze, affrontare sfide inedite e ridefinire ruoli e responsabilità; tuttavia, l'evoluzione in atto promette di rivoluzionare positivamente la produzione animale.

Nonostante i progressi ottenuti, persistono alcune criticità legate alla scarsa standardizzazione e alla limitata propensione, da parte di aziende e operatori, a partecipare a una condivisione strutturata e globale dei dati produttivi e molecolari. Questo freno rischia di rallentare i benefici dell'innovazione tecnologica. Tuttavia, con il progressivo aumento della digitalizzazione nelle aziende zootecniche, l'impiego di tecnologie di intelligenza artificiale e di sensori sarà destinato a crescere, giocando un ruolo chiave nell'identificazione di pattern e nella risoluzione di problemi complessi, contribuendo così a migliorare la redditività e la competitività del settore.

In particolare, la capacità di integrare dati eterogenei – dai dati di campo a quelli commerciali, dai parametri climatici a quelli relativi all'attività umana – rappresenterà un elemento centrale nello sviluppo di modelli predittivi. Tali modelli non si limiteranno più a rilevare la presenza di malattie o anomalie, ma potranno anticiparle, permettendo interventi tempestivi e mirati.

L'incremento dell'accessibilità a sensori, infrastrutture digitali e strumenti per la raccolta, archiviazione e analisi dei big data, unitamente all'adozione di standard aperti e all'integrazione con approcci di epidemiologia molecolare, costituisce una strategia promettente per affrontare una delle sfide più urgenti: produrre alimenti di maggiore qualità, più salubri, in quantità crescenti e con modalità sostenibili. In tal modo sarà possibile non solo tutelare gli ecosistemi fisici e le risorse naturali, ma anche promuovere in modo sinergico il benessere e la salute degli animali e dell'uomo.

LETTURE CONSIGLIATE

1. Aruwa, C. E., Pillay, C., Nyaga, M. M., & Sabiu, S. (2021). Poultry gut health – microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S40104-021-00640-9>
2. Astill, J., Dara, R. A., Fraser, E. D. G., Roberts, B., & Sharif, S. (2020). Smart poultry management: Smart sensors, big data, and the internet of things. *Computers and Electronics in Agriculture*, 170, 105291. <https://doi.org/10.1016/J.COM-PAG.2020.105291>
3. Boodhoo, N., Shoja Doost, J., & Sharif, S. (2024). Biosensors for Monitoring, Detecting, and Tracking Dissemination of Poultry-Borne Bacterial Patho-

- gens Along the Poultry Value Chain: A Review. In *Animals* (Vol. 14, Issue 21). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ani14213138>
4. Bumanis, N., Arhipova, I., Paura, L., Vitols, G., & Jankovska, L. (2022). Data Conceptual Model for Smart Poultry Farm Management System. *Procedia Computer Science*, 200, 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2022.01.249>
 5. Deblais, L., Kathayat, D., Helmy, Y. A., Closs, G., & Rajashekara, G. (2020). Translating “big data”: Better understanding of host-pathogen interactions to control bacterial foodborne pathogens in poultry. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 15–35. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000124>
 6. Franzo, G., Legnardi, M., Faustini, G., Tucciarone, C. M., & Cecchinato, M. (2023). When Everything Becomes Bigger: Big Data for Big Poultry Production. *Animals*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/ani13111804>
 7. Olejnik, K., Popiela, E., & Opaliński, S. (2022). Emerging Precision Management Methods in Poultry Sector. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050718>
 8. Sharma, V., Tripathi, A. K., & Mittal, H. (2022). Technological revolutions in smart farming: Current trends, challenges & future directions. *Computers and Electronics in Agriculture*, 201, 107217. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.107217>
 9. Wolfert, S., Ge, L., Verdouw, C., & Bogaardt, M. J. (2017). Big Data in Smart Farming – A review. *Agricultural Systems*, 153, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.023>



ATTI DEL 10° SIMPOSIO SCIENTIFICO

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Napoli (NA), 12-13 Settembre 2025

INFEZIONE DA POLYOMAVIRUS NEI PAPPAGALLI: VALUTAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE VIRALE NEGLI ORGANI E DELLA COMPROMISSIONE DEI TESSUTI COLPITI

Casalino G.¹, Bozzo G.¹, Messina D.², Tolini C.³, Bove A.¹, Lavazza A.³, D'Onghia F.¹, Lombardi R.¹, D'Amico F.⁴, Pellegrini F.¹, Martella V.¹, Camarda A.¹, Circella E.¹

¹ *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, S.P. Casamassima km. 3, 70010 Valenzano (BA), Italia;*

² *Division of Veterinary Clinical Science, School of Veterinary Medicine and Science, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, United Kingdom;*

³ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Virologia, Via Antonio Bianchi 7/9, 25124 Brescia, Italia;* ⁴ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.S. Genova e Portualità, Borgo Pila 39, 16129 Genova, Italia.*

Summary

Polyomaviruses (APVs) cause diseases in geese and pet birds. The clinical forms are especially severe in young and nestling individuals, while the adults often develop persistent infections, exposing young birds to early infection. Unlike polyomaviruses that infect mammals, APVs appear to be able to invade various tissues in infected birds. Based on the lack of specific available data concerning this issue, the aim of this study was to investigate the spread of APV, and the lesions associated with it in different organs of two baby parrots (a *Moluccan eclectus* and a blue-winged macaw) which died from APV infection. The lung appeared to be the most severely affected tissue in both birds, with balloon-shaped Cowdry type B intranuclear inclusion bodies, haemorrhagic areas, inflammatory cells and the total breakdown of the lung structure. Severe lesions were also found in the kidney and liver, and inclusion bodies were detected in the liver, especially. By contrast, even if inclusion bodies were not detected, severe lesions were found in the myocardium, bursa of Fabricius and spleen, which were probably responsible for the secondary infections found in both baby parrots. Viral particles were detected in several tissues by negative staining electron microscopy. Indeed, well-defined viral particles were found in the tissues from the eclectus, while polyomavirus-like particles were prevalent in the blue-winged macaw. The severity of lesions and the finding of viral particles were not always linked to the amount of DNA copy number/ng of tissue that was more similar in the tissues of the eclectus, ranging from 2.47×10^3 DNA copy number/ng found in the myocardium to 3.90×10^6 found in the feather quills, than in those of blue-wing macaw, where viral DNA ranged from 1.07×10^1 detected in the brain to 1.82×10^7 found in the gut. The results of this study highlight the ability of APV to spread widely in the tissues of the infected birds, leading to severe lesions. In addition, the greatest amount of viral DNA detected in the gut and feathers of the blue-wing macaw and the eclectus, respectively, highlights the relevance of faeces and feathers as useful samples for the *in vivo* diagnosis.

INTRODUZIONE

La famiglia *Polyomaviridae* è costituita da virus privi di envelope, a simmetria icosaedrica con DNA circolare a doppio filamento di circa 5.000 paia di basi e comprende sei generi che infettano gli ospiti con una certa specificità: alpha-, beta- e delta-*polyomaviruses* infettano principalmente l'uomo e altri mammiferi, mentre gamma-, epsilon- e zeta-*polyomaviruses* infettano rispettivamente gli uccelli, le balene e i delfini (Walker *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022).

Diversi polyomavirus aviari (Avian Polyomaviruses - APVs) sono stati identificati in differenti specie, ma quelli più importanti e noti si riscontrano nei pappagalli (Budgerigar fledgling disease virus - BFDV), negli uccelli da gabbia (Canary polyomavirus – CaPyV; *Erythrura gouldiae* polyomavirus EgouPyV; Finch polyomavirus – FPyV), e, tra le specie di interesse zootecnico, nell'oca (Goose Hemorrhagic polyomavirus (GHPyV) (Johnes *et al.*, 2006; Heenemann *et al.*, 2015; Marton *et al.*, 2016; Feher *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022).

Diversamente da polyomavirus che infettano i mammiferi (MPVs), in cui causano malattia più spesso in caso di immunodepressione, quelli aviari causano patologie gravi in volatili pienamente immunocompetenti (Johnes *et al.*, 2011). Nei canarini, CaPyV induce mortalità e numerose lesioni come emorragie sottocutanee, epato- e splenomegalia, deplezione del tessuto linfoide e alterazioni renali (Halami *et al.*, 2010). Nei pappagalli, come le cocorite in cui è stato riscontrato per la prima volta, ma anche in diverse altre specie (Gilardi *et al.*, 1995; Latimer *et al.*, 1996; Bert *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2006; Literak *et al.*, 2006; Kou *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2019), il virus induce epatite, ascite, emorragie sull'epicardio e sulle sierose e distensione addominale (Johnes *et al.*, 1998) e, in caso di infezioni croniche, anomalie al piumaggio (Davis *et al.*, 1981). Tali lesioni sono dovute al tropismo piuttosto ampio del virus e alla sua potenziale capacità di diffondere in numerosi organi (Phalen *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022), a differenza dei polyomavirus che infettano i mammiferi che hanno un tropismo più definito e limitato. Nonostante l'importanza di queste infezioni in alcune specie di volatili, come l'oca e le specie d'affezione, e la vasta letteratura disponibile su questi virus, non vi sono dati certi e approfonditi circa la distribuzione del virus nei diversi tessuti e il grado di coinvolgimento dei diversi organi in caso di infezione. Pertanto, lo scopo di questo studio è stato quello di investigare questi aspetti analizzando diversi organi di due pappagalli appartenenti ad altrettante specie diverse, deceduti per infezione naturale.

MATERIALI E METODI

Esemplari oggetto dello studio

Lo studio è stato condotto su due pappagalli, un ecletto (*Eclectus roratus*) e un esemplare di ara maracanà (*Primolius maracana*), deceduti per infezione da polyomavirus. I due soggetti provenivano da uno stesso centro di raccolta e rivendita di pappagalli, provenienti da allevamenti diversi sia del nord che del sud Italia, al fine di completare lo svezzamento a mano e poi destinarli alla vendita diretta al dettaglio. L'esemplare di ara ha manifestato, presso la struttura, perdita di peso e ridotta vitalità. Trattato dal gestore del centro di vendita con amoxicillina/acido clavulanico e nistatina, è deceduto dopo circa 15 giorni di malessere, dopo aver raggiunto un mese e mezzo di età. L'ecletto è stato acquistato da un privato all'età

di due mesi, è apparso rapidamente ipovitale ed è deceduto dopo tre giorni dall'acquisto. Il rivenditore, consegnando l'esemplare di ara per l'autopsia, non ha voluto rilasciare informazioni sugli altri esemplari di nidiacei presenti presso il centro di vendita. Le autopsie di entrambi i pappagalli e le relative analisi di laboratorio sono state effettuate presso la sezione di Patologia aviaria del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari.

Esami batteriologici

Gli esami batteriologici sono stati condotti da fegato e sangue del cuore di entrambi i pappagalli su agar sangue (Triptic Soy agar e sangue di pecora al 5%) e McConkey agar (OXOID) a 37° C per 24 h. In base alle lesioni riscontrate sulle sierose dell'eclotto, in questo soggetto è stato esteso l'esame batteriologico ai sacchi aerei e, inoltre, effettuata la ricerca di miceti su Sabouraud agar (OXOID) dai granulomi.

Esami istologici

Campioni di fegato, polmone, rene, borsa di Fabrizio, milza, miocardio, sono stati raccolti e posti in formalina al 10%. I campioni sono stati fissati in blocchi di paraffina, e preparate sezioni di 4 mm colorate in ematossilina ed eosina (H&E).

Microscopia elettronica

Omogenati al 10% p/v di milza, polmone, fegato, rene, stomaco, intestino e penne sono stati preparati presso la sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna (Lavazza et al., 1990), ed esaminati mediante tecniche di colorazione negativa (NaPT 2% per 1,5 min) previa ultracentrifugazione con Airfuge, ed esaminati con un microscopio elettronico a trasmissione Tecnai G2 Spirit (TEM; FEI, Eindhoven, The Netherlands) operante a 85 kV, a 19–30000x. Le particelle virali sono state identificate in base alle loro caratteristiche morfologiche.

Screening preliminare per Circovirus e Polyomavirus

Campioni di fegato, milza e rene sono stati analizzati in PCR per *circovirus* (Circella et al., 2014) e *polyomavirus* (Circella et al., 2017). Tutti i campioni sono risultati positivi per *polyomavirus* e negativi per *circovirus*.

Real-Time PCR

Sedici diversi organi (sacchi aerei, cervello, borsa di Fabrizio, occhio, penne, stomaco ghiandolare, stomaco muscolare, intestino, ghiandola di Harder, rene, fegato, polmone, cuore, esofago, milza e testicolo) dell'eclotto e dodici organi (cervello, borsa di Fabrizio, occhio, penne, intestino, stomaco ghiandolare, rene, fegato, polmone, cuore, milza e testicolo) dell'ara sono stati analizzati in Real-time PCR, utilizzando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad, Milan, Italy) e i primers APVf (CTDGATGARAATGGGGTKGG) e APVr (ACMCGWACYTC-CTCMACCT) alla concentrazione di 5 pmol/μL, in un totale di 18 μL di mix di reazione a cui sono stati aggiunti 2 μL di DNA, mediante QuantStudio 6 systems SkanIt Software 7.01 RE (Applied Biosystems, Milan, Italy) e piattaforma Bio-

Rad CFX Maestro Connect. Il ciclo termico era: 98 °C per 3 minuti, 39 cicli a 98 °C per 15 secondi, 60 °C per 45 secondi, con curva di melting mediante incremento della temperatura da 65 °C a 95 °C aumentando di 0.5 °C ogni 5 secondi.

RISULTATI

Lesioni macroscopiche ed analisi di laboratorio

Le lesioni macroscopiche prevalenti nell'ara sono risultate le emorragie, osservate principalmente sul tessuto sottocutaneo e sui muscoli. All'apertura della cavità toraco-addominale, si osservava inoltre pallore del miocardio e degenerazione del fegato e dei reni. Nell'eclotto, veniva riscontrato idropericardio, emorragie sul pericardio, epatite con aree degenerative, ipoplasia della milza e degenerazione renale. Inoltre, si evidenziava essudato caseoso nei sacchi aerei e alcuni granulomi compatibili con aspergilloso sul pericardio e sul sacco aereo toracico sinistro. Dal fegato e dal sangue del cuore dell'ara è stato isolato *Escherichia coli*. Dagli organi dell'eclotto è stato isolato *Pseudomonas aeruginosa* e, dai granulomi, *Aspergillus spp.*

Esami istologici

Inclusi intranucleari Cowdry B-type sono stati riscontrati nelle sezioni di fegato, rene e polmone di entrambi i pappagalli. Per quanto le lesioni siano risultate gravi in diversi tessuti, il polmone è apparso l'organo più colpito, con aree emorragiche, una radicale alterazione del tessuto e i bronchioli pieni di essudato ricco di neutrofili e cellule necrotiche. Degenerazione dei tubuli renali e atrofia glomerulare sono stati evidenziati in entrambi i pappagalli. Le alterazioni epatiche, agglomerate di cellule infiammatorie, aree emorragiche e di necrosi, erano invece più evidenti nell'eclotto e meno marcate nell'ara. Nonostante non siano stati evidenziati corpi inclusi, nelle sezioni di milza e borsa di Fabrizio sono state evidenziate aree emorragiche e deplezione linfoide. Analogamente, in apparente assenza di corpi inclusi, il miocardio presentava infiltrazioni di cellule infiammatorie, necrosi e degenerazione.

Microscopia elettronica

Polyomavirus è stato identificato, mediante microscopia elettronica, in entrambi i pappagalli in quantitativi variabili a seconda dell'organo (Tabella 1). Tuttavia, mentre nei campioni dell'eclotto le particelle virali erano ben definite e riconoscibili, nei campioni dell'ara, ad eccezione della milza in cui erano ben definite, venivano identificate particelle polyomavirus-like.

Real-Time PCR

I quantitativi di DNA virale riscontrato nei diversi organi dei due pappagalli sono riportati nella tabella 1. Nell'ara il quantitativo più elevato è stato trovato nell'intestino (1.82×10^7) mentre quello più basso nel cervello (1.07×10^1), mentre nell'eclotto i valori sono risultati un po' più omogenei con i più alti nelle penne (3.90×10^6) e i più bassi nel miocardio (2.47×10^3). Per quanto riguarda gli organi più interessati dalle lesioni istologiche, il polmone nell'eclotto è risultato il secondo organo per quantitativi di DNA virale riscontrato (5.38×10^5) mentre nell'ara è risultato il settimo organo, tra quelli considerati, con 4.27×10^3 copie di DNA/ng. Nei reni sono state riscontrate 1.36×10^5 copie di DNA/ng nell'ara maracanà e 3.78×10^4 nell'eclotto, mentre

nel fegato ii quantitativi sono risultati rispettivamente 1.63×10^4 nell'ara maracanà e 8.91×10^3 nell'eletto. Tra gli organi linfoidi, la milza presentava quantitativi virali simili nei due pappagalli, 8.02×10^5 nell'ara e 3.29×10^5 nell'eletto, analogamente alla borsa di Fabrizio con 3.14×10^3 nell'eletto e 1.16×10^3 nell'ara. DNA virale è stato identificato anche nei testicoli di entrambi i pappagalli con 1.18×10^3 copie di DNA/ng nell'ara 6.24×10^3 nell'eletto, e nel cervello in quantità pari a 1.07×10^1 nell'ara e 2.70×10^4 nell'eletto.

Tabella 1. DNA virale (RT-PCR) e particelle virali (microscopia elettronica) evidenziate nei differenti organi dei due pappagalli.

Organo	ARA MARACANÀ		ECLETTTO	
	N° copie DNA/ng	Particelle virali	N° copie DNA/ng	Particelle virali
Sacco aereo	NA*	NA	4.13×10^4	NA
Cervello	1.07×10^1	NA	2.70×10^4	NA
Borsa di Fabrizio	1.16×10^3	NA	3.14×10^3	NA
Occhio	1.65×10^2	SNA	7.34×10^3	NA
Penne	2.41×10^4	+	3.90×10^6	++
Stomaco ghiandolare	NA	NA	2.27×10^4	ND
Intestino	1.82×10^7	ND	2.84×10^4	++
Ghiandola di Harder	NA	NA	3.95×10^3	NA
Rene	1.36×10^5	ND	3.78×10^4	NA
Fegato	1.63×10^4	NA	8.91×10^3	ND
Polmone	4.27×10^3	++	5.38×10^5	+
Miocardio	1.09×10^1	NA	2.47×10^3	NA
Esofago	NA*	NA	6.53×10^3	NA
Proventricolo	2.33×10^6	++	1.14×10^4	ND
Milza	8.02×10^5	++	3.29×10^5	++
Testicolo	1.18×10^3	NA	6.24×10^4	NA

NA: non analizzato; ND: Nessuna particella virale identificata per campo di osservazione;

+: da 1 a 5 particelle virali identificate in tutto il vetrino

++: da 1 a 5 particelle virali identificate in ciascun campo di osservazione

DISCUSSIONE

I due pappagalli infetti provenivano dallo stesso centro di raccolta e vendita e, anche se non è chiaramente possibile dedurre precisamente le modalità di infezione, questo evidenzia il rischio sanitario di questo tipo di centro vendita che comporta il convogliamento da più allevamenti di nidiacei che si trovano a convivere a stretto contatto tra loro per il periodo di svezzamento a mano, prima di essere rivenduti, incrementando il rischio di trasmissione del virus e di sviluppo di forme cliniche particolarmente severe e con mortalità elevata, in soggetti estremamente sensibili in quanto nidiacei (Phanel *et al.*, 2000; Phalen *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 2006; Szweda

et al., 2011). Le lesioni macroscopiche ed istologiche hanno coinvolto organi vitali come il fegato, il rene, i polmoni, portando i soggetti da una morte repentina, ma anche gli organi linfoidi induce un probabile crollo delle difese immunitarie con il riscontro, in entrambi i nidiacei, di infezioni secondarie, batteriche e micotiche. La distribuzione del virus nei diversi organi è apparsa più omogenea nell'eclotto con quantitativi di DNA virale variabili da 2.47×10^3 copie/ng di tessuto riscontrate nel miocardio a 3.9×10^6 nelle penne, rispetto all'ara in cui variavano da 1.07×10^1 nel cervello a 1.82×10^7 nel contenuto intestinale. Il virus è stato riscontrato in tutti i tessuti analizzati, evidenziando l'ampio coinvolgimento di diversi organi nell'infezione, legato molto probabilmente all'ampio tropismo tissutale di APV. Uno studio condotto su APV delle cocorite BFDV evidenzia che le proteine VP4 e VP4 delta sono in grado di legare il precursore dell'interferone β , prevenendo la sua produzione agevolando la replicazione massiva di questi virus APVs nelle cellule ospiti (Ma *et al.*, 2019), a differenza di alcuni polyomavirus umani come JC che sembrano stimolare l'espressione interferone α e β con conseguente riduzione della replicazione virale (Co *et al.*, 2007; Assetta *et al.*, 2016). Inoltre, APVs inducono apoptosi e non necrosi come MPVs, evadendo più facilmente la risposta immunitaria dell'ospite (Johnes *et al.*, 2000; Johnes *et al.*, 2006; Johnes *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2022), e hanno tropismo anche per gli endoteli inducendo tipicamente emorragie (Dobos *et al.*, 2005), che sono state riscontrate microscopicamente nei due pappagalli analizzati e, nel caso dell'ara, anche spiccatamente come lesioni macroscopiche. La gravità delle lesioni riscontrate è risultata variabile in base all'organo. A carico del rene, in cui erano presenti 1.36×10^5 e 3.78×10^4 copie di DNA virale per ng di tessuto rispettivamente nell'ara e nell'eclotto, è stata evidenziata degenerazione dei tubuli, atrofia glomerulare e corpi inclusi intranucleari. Nelle infezioni da APV quest'organo è tipicamente colpito sia nell'oca in cui si osserva nefrite interstiziale (Lacroux *et al.*, 2004), sia nei volatili d'affezione e da voliera con degenerazione delle cellule tubulari, atrofia glomerulare e assottigliamento dei capillari glomerulari nei fringillidi (Circella *et al.*, 2017), nefrite emorragica nei canarini (Halami *et al.*, 2010), necrosi, iperemia, infiltrazione di cellule infiammatorie (Swedza *et al.*, 2011), assottigliamento dei capillari renali (Phalen *et al.*, 1996; Gerlach *et al.*, 1998), e lesioni glomerulari di gravità variabile, nei pappagalli, a seconda della specie (Phalen *et al.* 1996). Analogamente, associate a 1.63×10^4 copie di DNA virale/ng nell'ara e 8.91×10^3 nell'eclotto, le lesioni evidenziate nel fegato sono state piuttosto severe, con il riscontro di corpi inclusi, infiltrazione di cellule infiammatorie, emorragie e necrosi, in maniera simile a quanto evidenziato in pappagalli (Ozmen *et al.*, 2004; Swedza *et al.*, 2011), canarini (Halami *et al.*, 2010) e fringillidi (Circella *et al.*, 2017) deceduti per infezione da APV. La severità delle lesioni non è risultata costantemente correlata alla quantità di DNA virale riscontrata nell'organo. Aree emorragiche, cellule infiammatorie, congestione, necrosi e corpi inclusi sono stati evidenziati in maniera similari nei polmoni di entrambi i pappagalli, associati a quantitativi di DNA virale differenti, pari a 5.38×10^5 nell'eclotto e 4.27×10^3 nell'ara. Allo stesso modo, lesioni simili per entità erano associate nel miocardio a quantità virali significativamente. Analogamente a quanto evidenziato nell'oca in caso di infezione da GHPV (Lacroux *et al.*, 2004) e in diverse specie di pappagalli (Gerlach *et al.*, 1998, Swedza *et al.*, 2011), nella milza di entrambi i nidiacei analizzati, sono state evidenziate deplezione del tessuto linfoide e aree emorragiche, con conseguente probabile immunodepressione che ha

causato l'insorgenza di infezioni secondarie da *Escherichia coli* nel caso dell'ara e da *Pseudomonas aeruginosa* nell'eclotto. Nella milza di entrambi i soggetti, i quantitativi di DNA virale superavano 3×10^5 copie/ng e numerose particelle virali sono state evidenziate, come singoli virioni o organizzate in clusters, in microscopia elettronica. Questo sembrerebbe confermare la correlazione tra la numerosità di particelle virali evidenziate e quantitativi di DNA virale riscontrati (Literak *et al.*, 2006). Ad ulteriore conferma, le particelle virali sono state evidenziate in campioni come le penne dell'eclotto e lo stomaco dell'ara, dove il DNA virale superava 10^6 copie/ng. Tuttavia, nel caso del fegato dell'eclotto e del rene dell'ara, in cui il DNA virale era pari rispettivamente a 8.91×10^3 e 1.36×10^5 copie/ng, non sono state evidenziate particelle virali, analogamente al campione intestinale dell'ara in cui il DNA virale risultava decisamente superiore, in quanto pari a 1.82×10^7 . Pertanto, in base a questi risultati, il riscontro delle particelle virali in microscopia elettronica non sembrerebbe correlato alla quantità di DNA virale, quanto piuttosto dipendente da altri fattori e, verosimilmente, allo stato di conservazione dei campioni che può essere non omogeneo e ottimale per tutti, nonché alla fase di evoluzione più o meno acuta della malattia al momento del campionamento.

CONCLUSIONI

In conclusione, anche se in quantitative differenti a seconda del tessuto, il DNA virale è stato riscontrato in tutti gli organi analizzati evidenziando un'elevata capacità diffusiva di APV in un'ampia gamma di tessuti in caso di infezione. Il coinvolgimento massivo nell'infezione di fegato, reni, polmoni ed organi linfoidi evidenzia l'estrema gravità dell'infezione nei soggetti giovani tanto da comprometterne la sopravvivenza. Un aspetto molto interessante è emerso dai valori più elevati di DNA virale riscontrati nei campioni dei due pappagalli e corrispondenti al contenuto intestinale (1.82×10^7), nel caso dell'ara, e alle penne (3.90×10^6), nel caso dell'eclotto, evidenziando la rilevante fonte di contaminazione che questi materiali biologici rappresentano, soprattutto in caso di allevamenti, negozi di animali e nursery, in cui più pappagalli convivono in uno stesso ambiente. Inoltre, alla luce di questi risultati, feci e penne, soprattutto se analizzati contemporaneamente possono rappresentare campioni molto utili e attendibili per effettuare la diagnosi dell'infezione *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. Assetta B, De Cecco M, O'Hara B, and WJ Atwood. (2016). JC polyomavirus infection of primary human renal epithelial cells is controlled by a type I IFN-induced response. *MBio*. 7:10-1128.
2. Bert E, Tomassone L, Peccati C, Navarrete MG and SC Sola. (2005). Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. Vet. Med. B*. 52:64-68.
3. Circella E, Caroli A, Marino M, Legretto M, Pugliese N, Bozzo G, Coccio G, Dibari D, and A Camarda. (2017). Polyomavirus infection in Gouldian finches (*Erythrura gouldiae*) and other pet birds of the family Estrildidae. *J. Comp. Pathol.* 156:436-439.
4. Circella E, Legretto M, Pugliese N, Caroli A, Bozzo G, Accogli G, Lavazza A, and A Camarda. (2014). Psittacine beak and feather disease-like illness in Gouldian finches (*Chloebia gouldiae*). *Avian Dis.* 58:482-487.

5. Co JK, Verma S, Gurjav U, Sumibcay L, and VR Nerurkar. (2007). Interferon- α and- β restrict polyomavirus JC replication in primary human fetal glial cells: Implications for progressive multifocal leukoencephalopathy therapy. *J. Infect. Dis.* 196:712-718.
6. Davis RB, Bozeman LH, Gaudry D, Fletcher OJ, Lukert PD, and MJ Dykstra. (1981). A viral disease of fledgling budgerigars. *Avian Dis.* 179-183.
7. Dobos-Kovács M, Horváth E, Farsang A, Nagy E, Kovács A, Szalai F, and S Bernáth. (2005). Haemorrhagic nephritis and enteritis of geese: pathomorphological investigations and proposed pathogenesis. *Acta Vet. Hung.* 53:213-223.
8. Fehér E, Kaszab E, Bali K, Hoitsy M, Sós E, and K Bányai. (2022). A novel gammapolyomavirus in a great cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Arch. Virol.* 167:1721-1724.
9. Gerlach H, Enders F, Casares M, Müller H, Johne R, and T Hänichen. (1998). Membranous glomerulopathy as an indicator of avian polyomavirus infection in Psittaciformes. *J. Avian Med. Surg.* 248-254.
10. Gilardi KV, Lowenstine LJ, Gilardi JD, and CA Munn. (1995). A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. *J. Wildl. Dis.* 31:523-528.
11. Halami MY, Dorrestein GM, Couteel P, Heckel G, Muller H, and R Johne. (2010). Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *J. Gen. Virol.* 91:3016-3022.
12. Heenemann K, Sieg M, Rueckner A, and TW Vahlenkamp. (2015). Complete genome sequence of a novel avian polyomavirus isolated from Gouldian finch. *Genome Announc.* 3:10-1128.
13. Hsu CM, Ko CY, and HJ Tsai. (2006). Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan. *Avian Dis.* 50:348-353.
14. Johne R and H Müller. (1998). Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch. Virol.* 143:1501-1512.
15. Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, and LC Norkin. (2011). Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 156:1627-1634.
16. Johne R, Jungmann A, and H Müller H (2000). Agnoprotein 1a and agnoprotein 1b of avian polyomavirus are apoptotic inducers. *J. Gen. Virol.* 81:1183-1190.
17. Johne R, and H Müller. (2007). Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J. Virol.* 81:11554-11559.
18. Johne R, Wittig W, Fernández-de-Luco D, Höfle U, and H. Müller. (2006). Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J. Virol.* 80:3523-3531.
19. Kou Z, Zhang Z, Chen S, Fan Z, Tang S, Zhao L, and T Li. (2008). Molecular characterizations of avian polyomavirus isolated from budgerigar in China. *Avian Dis.* 52:451-454.
20. Lacroux C, Andreoletti O, Payre B, Pingret JL, Dissais A, and JL Guerin. (2004). Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus. *Avian Pathol.* 33:351-358.

21. Latimer KS, Niagro FD, Steffens WL, Ritchie BW, and RP Campagnoli. (1996). Polyomavirus encephalopathy in a Ducorps cockatoo (*Cacatua ducorpsii*) with psittacine beak and feather disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:291-295.
22. Lavazza A, Pascucci S, and D Gelmetti. (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet. Rec.* 126:581.
23. Literák I, Šmíd B, Dubská L, Bryndza L, and L Valíček. (2006). An outbreak of the polyomavirus infection in budgerigars and cockatiels in Slovakia, including a genome analysis of an avian polyomavirus isolate. *Avian Dis.* 50:120-123.
24. Liu FL, Chang SP, Liu HJ, Liu PC, and CY Wang. (2022). Genomic and phylogenetic analysis of avian polyomaviruses isolated from parrots in Taiwan. *Virus Res.*, 308:198634.
25. Ma J, Wu R, Tian Y, Zhang M, Wang W, Li Y, Tian F, Cheng Y, Yan Y, and J Sun. (2019). Isolation and characterization of an Aves polyomavirus 1 from diseased budgerigars in China. *Vet. Microbiol.* 237:108397.
26. Marton S, Erdélyi K, Dán Á, Bányai K, and E Fehér. (2016). Complete genome sequence of a variant *Pyrrhula pyrrhula* polyomavirus 1 strain isolated from white-headed munia (*Lonchura maja*). *Genome Announc.* 4:10-1128.
27. Ogawa H, Chahota R, Hagino T, Ohya K, Yamaguchi T, and H Fukushi. (2006). A survey of avian polyomavirus (APV) infection in imported and domestic bred psittacine birds in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 68:743-745.
28. Özmen Ö, and GM Dorrestein. (2004). Avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28:409-414.
29. Phalen DN, Radabaugh CS, Dahlhausen RD, and DK Styles. (2000). Viremia, virus shedding, and antibody response during natural avian polyomavirus infection in parrots. *JAVMA.* 217:32-36.
30. Phalen DN, Wilson VG, and DL Graham. (1993). Organ distribution of avian polyomavirus DNA and virus-neutralizing antibody titers in healthy adult budgerigars. *Am. J. Vet. Res.* 54:2040-2047.
31. Phalen DN, Wilson VG, DL Graham. (1996). Characterization of the avian polyomavirus-associated glomerulopathy of nestling parrots. *Avian Dis.* 140-149.
32. Riaz A, Yousaf A, Moaeen-ud-Din M, Shah MA, Zainab T, Masood S, Akhter N, and A Ali. (2019). First detection and molecular characterization of avian polyomavirus in young parrots in Pakistan. *Vet. Res. Commun.* 43:197-202.
33. Szweda M, Kołodziejska A, Szarek J, and I Babińska. (2011). Avian polyomavirus infections in Amazon parrots. *Med. Weter.* 67:147-150.
34. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Dempsey DM, Harrach B, Harrison RL, Hendrickson RC, et al. (2020). Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 165:2737-2748.
35. Wang CW, Chen YL, Mao SJ, Lin TC, Wu CW, Thongchan D, Wang CY, and HY Wu. (2022). Pathogenicity of avian polyomaviruses and prospect of vaccine development. *Viruses.* 14:2079.

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFICACIA ANTIMICROBICA DEI TIOSULFONATI NEI CONFRONTI DI STIPITI DI *SALMONELLA* APPARTENENTI A SIEROTIPI RILEVANTI

Casalino G.¹, D'Amico F.², Bozzo G.¹, Bove A.¹, Salierno D.¹, Romito D.¹, Perna V.¹, Camarda A.¹, Circella E.¹

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

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, S.S. Genova e Portualità, Borgo Pila 39, 16129 Genova, Italy

Summary

The new National Plan for the Control of Salmonellosis in Poultry (PNCS 2025–2027) aims to reduce the prevalence of relevant *Salmonella* (*S.*) serotypes below the thresholds established by the European Union by strengthening control and prevention measures. In addition to conventional strategies focused on biosecurity, vaccines and the improvement hygienic measures, the plan promotes the study of natural substances compounds that can be used to reduce the antibiotic use and the risk of antimicrobial resistance. Therefore, the aim of this study was to *in vitro* evaluate the antimicrobial efficacy of thiosulfonates from *Allium spp.* against 46 strains of *S. Enteritidis* and 4 *S. Infantis* strains which were previously isolated in laying hen farms. The efficacy of thiosulfonates in concentrations ranging from 0.15 to 5 µL/mL (0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, and 5 µL/mL) was evaluated against the bacteria tested at 10⁵ CFU/mL density. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. The MIC values ranged from 0.6 µL/mL to 2,5 µL/mL for strains of *S. Enteritidis* while they ranged from 0,6 to 5 µL/mL for *S. Infantis* strains. The MBC values were variable according to the tested strain, but they resulted higher than 5 µL/mL for 16 (34.8%) *S. Enteritidis* strains and 2 (50%) *S. Infantis* strains. In addition, a variability of both MIC and MBC values was found depending on the strains and the farm where they came from. In conclusion, thiosulfonates are effective against *Salmonella* strains. Based on the obtained results, thiosulfonates have inhibitory rather than bactericidal activity and is effective also against high bacterial density. These findings suggest the potential use of this product as a preventive measure to reduce *Salmonella* spread among poultry in field conditions.

INTRODUZIONE

Le salmonellosi rappresentano una delle principali zoonosi a trasmissione alimentare, con un impatto significativo sulla salute pubblica e sulla sicurezza della filiera avicola (Antunes et al., 2016; Eng et al., 2015; Nirmala et al., 2018; Shivaprasad et al. 2000; Tariq et al., 2022). I sierotipi principalmente responsabili di malattia nell'uomo appartengono alla specie *Salmonella* (*S.*) *enterica* sottospecie *enterica*, e sono rappresentati da *S. enterica enterica* sierotipo Enteritidis e *S. enterica enterica* sierotipo Tiphymurium. Tali sierotipi rientrano tra quelli definiti rilevanti per la salute pubblica. Per far fronte alla problematica delle salmonellosi, l'Italia ha adottato, in conformità alla normativa europea (Reg. (UE) 2160-03; Reg. (UE) 2019/6), dei piani

pluriennali di controllo con lo scopo di ridurre la prevalenza *Salmonella* appartenente a sierotipi rilevanti negli allevamenti di polli da carne, ovaiole e tacchini. Il nuovo Piano Nazionale di Controllo delle Salmonellosi negli Avicoli 2025–2027 (PNCS) sostituisce il precedente piano triennale 2022–2024, introducendo importanti novità normative, nuovi protocolli operativi al fine di contenere la diffusione di *Salmonella* negli allevamenti avicoli. Il PNCS 2025–2027 conferma l’attenzione primariamente verso i sierotipi da sempre più rilevanti per la salute umana, *S. Enteritidis* ed *S. Typhimurium*, che rappresentano da anni i principali agenti eziologici delle salmonellosi umane in Europa e nel mondo (EFSA 2024), e *S. Infantis*, quest’ultimo soprattutto presente nei broiler e sempre più frequentemente isolato in Europa (EFSA 2024; Sima et al., 2024). Inoltre, in base ai risultati ottenuti dall’attuazione del precedente piano nazionale 2022–2024 che evidenziano una stabilità per quanto concerne la prevalenza dei gruppi positivi ai sierotipi rilevanti per tutte le categorie produttive ma anche un tendente incremento del riscontro di gruppi, soprattutto di tacchini e polli da carne, positivi per *Salmonella* spp., il PNCS 2025–2027 inserisce importanti modifiche per migliorare i sistemi di controllo anche nei confronti di *Salmonella* appartenenti a sierotipi considerati non rilevanti. Questa attenzione è giustificata non solo dall’incremento dell’incidenza di infezione nelle categorie produttive da carne, ma anche dal riscontro di un crescente numero di ceppi resistenti a più molecole antibiotiche. Tra questi sierotipi si annoverano *S. Kentucky*, *S. Heidelberg*, *S. Stanley*, *S. Derby*, *S. Javiana* (EFSA 2025; CDC 2020). Il PNCS 2025–2027, pertanto, oltre a rendere il sistema dei controlli ufficiali e degli autocontrolli più stringente, ponendo particolare attenzione alla tempestività con cui vengono gestiti i campioni, inserendo l’obbligo di utilizzo di una scheda ufficiale di campionamento, l’obbligo di campionamenti ambientali negli allevamenti, soprattutto di polli da carne e i tacchini, in cui sono presenti positività ripetute nel tempo, impone la tipizzazione di tutti i ceppi isolati, indipendentemente dal sierotipo di appartenenza. Oltre a tali misure, il piano ribadisce l’importanza della biosicurezza, del miglioramento delle pratiche igienico-sanitarie e dell’utilizzo di vaccini autorizzati e approvati specificamente per uso avicolo (Reg. CE 2160/2003; Dir. 2004/28/CE), preferenzialmente di tipo inattivato e che non debbano in alcun modo interferire con i protocolli diagnostici ufficiali e, per i vaccini vivi, con uso consentito solo a condizione che sia possibile discriminare i ceppi vaccinali da quelli di campo. Inoltre, il piano promuove l’utilizzo di sostanze alternative agli antibiotici, come probiotici, prebiotici, acidi organici, oli essenziali, batteriofagi e acidificanti che si sono mostrati efficaci nel ridurre la colonizzazione intestinale da *Salmonella* spp. e nel modulare positivamente il microbiota intestinale del pollame contribuendo, allo stesso tempo, al contenimento della resistenza antimicrobica (Gaggia et al, 2010; Ricke, 2018; Burt, 2004; Chouhan et al, 2017). In questo contesto si inserisce l’interesse sempre crescente nei confronti dello studio di composti naturali ad azione antimicrobica utilizzabili nella prevenzione, come strumento di controllo delle infezioni negli allevamenti (Guedes 2024). Fra questi, le specie vegetali appartenenti al genere *Allium* hanno numerose funzioni biologiche, tra cui attività antinfiammatoria, anti-aterosclerotica, antidiabetica, antimutagenica, anticarcinogenica, antiossidante e immunomodulante (Chen 2021; Cullen 2005; Kim 2016). Inoltre, *Allium* spp. sembra possedere proprietà antimicrobiche nei confronti di diversi patogeni (Circella 2022; Sallam 2023). Tali effetti sono legati alla presenza di composti organosolforati, come i tiosolfonati (Marefati 2021; Tapiero 2004), presenti sia nell’aglio che nella cipolla, responsabili del loro odore pungente

caratteristico e delle proprietà terapeutiche (Macpherson 2005).

Lo scopo di questo studio è stato di valutare l'efficacia antimicrobica di un prodotto commerciale contenente composti organosolfurati (OSCs), in particolare tiosulfonati derivati da *Allium* spp., nei confronti di ceppi di *Salmonella enterica* appartenenti a sierotipi rilevanti isolati in allevamenti avicoli.

MATERIALI E METODI

Tiosulfonati utilizzati per lo studio

Per questa ricerca, è stato utilizzato un prodotto (Phyto-L, Pro Tech Animal Nutrition s.r.l.) contenente tiosulfonati derivati dall'aglio (*Allium sativum*), in concentrazione pari a 170.000 µg/mL, in un veicolo inerte (gliceril polietilenglicole ricinoleato - E-484).

Stipiti batterici utilizzati e preparazione delle sospensioni batteriche

La ricerca è stata condotta su 46 ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis e 4 di *Salmonella enterica* sierotipo Infantis, precedentemente isolati rispettivamente in 12 e 2 differenti aziende di galline ovaiole, a partire da campioni ambientali (polvere e calzari), da uova e da tamponi cloacali, e conservati a -20°C in Brucella broth e glicerolo al 10% presso la Sezione di Patologia aviare del Dipartimento di Medicina di Bari. Da ciascun ceppo, scongelato su TSA (Tryptic Soy agar) a 37°C per 24 ore, è stata allestita in soluzione fisiologica sterile una sospensione batterica pari a 0.5 Mc Farland (1-2x 10⁸ UFC/mL), successivamente diluita scalarmente per ottenere la concentrazione finale voluta, pari a 10⁵ UFC/mL.

Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC)

Le prove sono state eseguite in Mueller Hinton Broth (Oxoid) secondo una metodica precedentemente messa a punto presso la sezione di Patologia aviare (D'Amico et al., 2022). Brevemente, il brodo è stato ricostituito seguendo le indicazioni della casa produttrice e sterilizzato in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Dopo averlo portato in bagno termostato a 50 °C, sono stati aggiunti i tiosulfonati, previamente diluiti in DMSO nel rapporto di 9:1 in favore dei tiosulfonati, in concentrazioni variabili da 0,15 e 5 µL/mL (0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5 µL/mL), scelte in base ad una precedente valutazione da noi condotta (D'Amico et al., 2022). 100 µL dei brodi preparati sono stati dispensati in provette Eppendorf, a cui sono stati aggiunti 10 µL di ogni sospensione batterica. Come controllo positivo di crescita, ogni sospensione batterica è stata inoculata nel brodo privo di tiosulfonati ma contenente DMSO alla massima concentrazione impiegata nelle prove (0,2%). I brodi sono stati incubati a 37 °C per 24 ore in aerobiosi. Al termine dell'incubazione, è stata valutata l'eventuale comparsa di torbidità, indicativa della crescita batterica. La concentrazione minima inibente (MIC) di tiosulfonati è stata considerata la concentrazione più bassa in grado di inibire la crescita batterica e mantenere il brodo limpido.

Determinazione della concentrazione minima battericida (MBC)

La concentrazione minima battericida (MBC) è stata determinata secondo le linee guida del NCCLS (1999), con piccole modifiche. Per ogni ceppo batterico, su piastre Petri contenenti Mueller Hinton agar (Oxoid), precedentemente ricostituito e sterilizzato in autoclave, è stato seminato l'intero volume di brodo corrispondente alla MIC e alle

concentrazioni superiori alla MIC. Dopo incubazione delle piastre a 37 °C per 24 ore in aerobiosi, è stato determinato il valore di MBC come quello corrispondente alla più bassa concentrazione di tiosulfonati in presenza della quale non si osservava nessuna crescita sul terreno di coltura.

RISULTATI

Per quanto riguarda *S. Enteritidis*, il valore di MIC è risultato pari a 1,25 µL/mL per il 52,17% dei ceppi testati. Per 13 stipiti (28,3%) la MIC risultava 0,6 µL/mL mentre per 9 ceppi (19,6%) era 2,5 µL/mL (Tabella 1).

Tiosulfonati µL/mL (Concentrazione in mg/mL)	MIC N° di ceppi (%)	MBC N° di ceppi (%)
>5 (>0,85)	0 (0)	16 (34,8)
5 (0,85)	0 (0)	6 (13)
2,5 (0,425)	9 (19,6)	10 (21,7)
1,25 (0,2125)	24 (52,2)	6 (13)
0,6 (0,102)	13 (28,3)	8 (17,4)
0,3 (0,051)	0 (0)	N.D.*
0,15 (0,0255)	0 (0)	N.D.

* ND: non determinato.

Tabella 1. MIC e MBC di Phyto-L riscontrate per 46 stipiti di *S. Enteritidis*.

I valori di MBC risultavano tendenzialmente più elevati e, rispettivamente per 6 (13%) e 16 ceppi (34,8%), corrispondevano o erano superiori a 5 µL/mL.

Per quanto riguarda gli stipiti di *S. Infantis*, i valori di MIC sono risultati variabili da 0,6 a 5 µL/mL (Tabella 2), mentre i valori di MBC sono risultati pari a 1,25 µL/mL, 2,5 µL/mL e per 2 ceppi sono risultati pari superiori a 5 µL/mL.

Tiosulfonati µL/mL (Concentrazione in mg/mL)	MIC N° di ceppi (%)	MBC N° di ceppi (%)
>5 (>0,85)	0 (0)	2 (50)
5 (0,85)	1 (25)	0 (0)
2,5 (0,425)	1 (25)	1 (25)
1,25 (0,2125)	1 (25)	1 (25)
0,6 (0,102)	1 (25)	0 (0)
0,3 (0,051)	0 (0)	N.D.*
0,15 (0,0255)	0 (0)	N.D.

* ND: non determinato.

Tabella 2. MIC e MBC di Phyto-L riscontrate per 4 stipiti di *S. Infantis*.

Tabella 3. MIC e MBC di tiosulfonati riscontrate per gli stiptipi di *S. Enteritidis* a seconda della distribuzione nelle aziende.

	MIC						MBC								
	Concentrazione di tiosulfonati (µL/mL)														
	>5	5	2,5	1,25	0,6	>5	5	2,5	1,25	0,6	>5	5	2,5	1,25	0,6
Azienda (N° di ceppi testate)	N° di ceppi (%)						N° di ceppi (%)								
1 (3)	0 (0)	0 (0)	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4 (6)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0 (0)	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)
5 (13)	0 (0)	0 (0)	1 (7,7)	5 (38,5)	7 (53,8)	2 (15,4)	2 (15,4)	0 (0)	0 (0)	2 (15,4)	3 (23,1)	6 (46,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
8 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (88,9)	1 (11,1)	6 (66,7)	0 (0)	2 (22,2)	1 (11,1)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
9 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (80)	1 (20)	1 (20)	0 (0)	4 (80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
11 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
12 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

La maggiore numerosità dei ceppi di *S. Enteritidis* testati ha consentito di poter evidenziare una sensibilità differente dei batteri circolati nelle diverse aziende e nell'ambito di una stessa azienda (Tabella 3). Ad esempio, nel caso dell'azienda 5, per 5 (38,5%) dei 13 ceppi testati la MIC risultava pari a 1,25 µL/mL, per 7 (53,8%) era pari a 0,6 µL/mL e per 1 ceppo era pari a 2,5 µL/mL. La variabilità dei valori di MBC per gli stessi ceppi risultava anche più ampia, con 2 ceppi (15,4%), 3 (23,1%), 6 (46,1%) con valori di MBC rispettivamente di 2,5 µL/mL, 1,25 µL/mL, e 0,6 µL/mL, e un ceppo il cui valore di MBC era superiore a 5 µL/mL.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti dalla ricerca evidenziano una attività inibitoria dei tiosulfonati nei confronti di entrambi i sierotipi di *Salmonella* testati. L'efficacia del prodotto, attribuibile ai composti organosolforati in esso contenuti, rafforza e conferma l'utilità di ricorrere alle sostanze naturali, ed in particolare ai prodotti a base di aglio o suoi derivati che hanno mostrato efficacia anche in precedenti altri studi, effettuati sia utilizzando stipiti di *Salmonella* Enteritidis (Circella et al., 2022), sia altri batteri come *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* (Andulem, 2013) e *Streptococcus mutans* (Jain, 2015). I valori di MIC ottenuti per *S. Enteritidis* in questo lavoro sono risultati variabili tra 0,6 µL/mL e 5 µL/mL, con leggere differenze rispetto ai ceppi di *S. Infantis*, che potrebbero essere attribuibili ad una diversa sensibilità, in base al diverso sierotipo, ad uno stesso principio naturale come già ipotizzato da alcuni autori (Ross et al, 2001). A supporto di tale ipotesi, uno studio (Mohsenipour et al., 2015) sull'efficacia dell'olio essenziale di aglio, condotto utilizzando i sierotipi *S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Typhimurium* ha evidenziato valori di MIC variabili, e compresi in un intervallo tra 0,34 mg/mL e 5,5 mg/mL, suggerendo una sensibilità sierotipo-specifica alla sostanza. I valori di MIC emersi nel presente studio sono risultati simili ma leggermente inferiori rispetto a quelli ottenuti in una ricerca precedente, condotta con lo stesso prodotto contenente tiosulfonati e con la stessa metodica di laboratorio, per valutarne l'efficacia antimicrobica nei confronti di ceppi di *E. coli* isolati da conigli (D'Amico et al., 2022). In questo caso, pur trattandosi per entrambi i batteri di germi gram negativi, la leggera differenza di risultati potrebbe esser legata alla diversa specie batterica analizzata, così come emerge da studi di valutazione dell'efficacia dell'aglio condotti adottando specie batteriche diverse in cui, analizzando *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella* Typhi, i valori di MIC variavano da 0,02 mg/mL a 0,2 mg/mL (Gull et al., 2012).

La diversa sensibilità alla sostanza potrebbe essere legata alle caratteristiche intrinseche delle diverse specie batteriche, come ad esempio la morfologia, la permeabilità di membrana e i possibili meccanismi di resistenza (Gahavam et al, 2022). Una possibile ragione che può portare invece a risultati diversi e spesso discordanti tra uno studio ed un altro è la mancanza di una standardizzazione dei protocolli utilizzati per valutare l'efficacia dei composti naturali, a differenza di quanto avviene per la valutazione dei farmaci. Ad esempio, in due ricerche condotte su ceppi di *Salmonella* Typhi sono state impiegate metodiche differenti: Andulem et al. (2013) hanno utilizzato una tecnica che si basa sulle diluizioni scalari in brodo, mentre Gull et al. (2012) hanno adottato un metodo di diffusione su agar, con modalità molto simile

al metodo Kirby–Bauer, impiegando dischetti imbevuti di estratto d’aglio preparati appositamente per la sperimentazione. Un ulteriore fattore di possibili variabilità dei dati potrebbe essere riconducibile alla diversa formulazione del principio attivo, come già ipotizzato in precedenti studi (Choo et al., 2020; Belguith, 2010). Inoltre, va sottolineato che l’allicina, principale tiosulfonato responsabile dell’attività antimicrobica dell’aglio, risulta estremamente instabile a causa della sua rapida degradazione in funzione della temperatura, del pH e del mezzo di conservazione (Fujisawa et al., 2008; Cubas-Martínez et al., 2014) e che le reazioni con composti endogeni, come aminoacidi, ne riducono ulteriormente la persistenza condizionandone così l’efficacia antimicrobica (Choo et al., 2020; Zhou et al., 2025).

Riguardo la concentrazione battericida minima (MBC), i valori ottenuti sono risultati decisamente più elevati dei corrispondenti valori di MIC, variando a seconda dei ceppi da 0,6 µL/mL fino a valori superiori a 5 µL/mL, evidenziando un’attività prevalentemente batteriostatica che battericida, analogamente a quanto riscontrato in precedenti studi su derivati dell’aglio (Mohsenipour, 2015; Circella et al., 2022) e indicando che, per ottenere una eventuale azione battericida sarebbe necessario utilizzare dosaggi del prodotto notevolmente più elevati e non compatibili con una situazione pratica aziendale. Inoltre, nei casi in cui è stato possibile analizzare più ceppi provenienti da una stessa azienda, è stata evidenziata una variabilità della sensibilità dei ceppi batterici piuttosto elevata anche nell’ambito della stessa azienda.

CONCLUSIONI

I tiosulfonati hanno mostrato efficacia nei confronti di stipiti di *Salmonella* appartenenti a sierotipi rilevanti, prevalentemente *S. Enteritidis* ma anche *S. Infantis*, con un’azione prettamente batteriostatica. Queste caratteristiche ne suggeriscono un potenziale utilizzo a fini preventivi negli allevamenti avicoli, per ridurre la circolazione di *Salmonella* nei gruppi allevati. L’efficacia inibitoria nei confronti dei ceppi di *Salmonella*, analizzati in cariche microbiche piuttosto elevate compatibili con uno stato di salmonellosi conclamato nel volatile, ne incrementa le potenzialità in caso di utilizzo in campo dove, invece, in caso di positività dei soggetti le concentrazioni per grammo di feci sono generalmente inferiori. L’utilizzo del prodotto potrebbe pertanto potenzialmente rientrare tra gli ausili per il controllo delle infezioni da *Salmonella* in campo avicolo, integrando le misure di biosicurezza e gli altri strumenti preventivi consentiti dalla normativa vigente.

BIBLIOGRAFIA

1. Antunes P, Mourão J, Campos J and LJ Peixe (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Inf.* 22(2): 110-121.
2. Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG and LH Lee. (2015). Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers Life Sci.* 8(3): 284-293.
3. Nirmala TV, Reddy AD, Karuna Sree E, Venkata Subbaiah K, Shali Raju G and RVSK Reddy. (2018). Salmonellosis in poultry: A case report. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7(2): 2347-2349.
4. Shivaprasad HL. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 405-424.

5. Unione Europea. (2003). *Regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 relativo al controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici trasmissibili tramite gli alimenti*. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 325, 1–15. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32003R2160>
6. Unione Europea. (2019). *Regolamento (UE) 2019/6 del Parlamento europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2018 relativo ai medicinali veterinari e che abroga la direttiva 2001/82/CE*. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 4, 43–167. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32019R0006>
7. European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2024). *The European Union One Health 2023 Zoonoses report*. EFSA Journal, 22(12), e09106. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106>
8. Sima CM, Buzilă ER, Trofin F, Păduraru D, Luncă C, Duhaniuc A and EV Nastase. (2024). Emerging strategies against non-typhoidal salmonella: from pathogenesis to treatment. *Current Issues in Mol. Biol.* 46(7): 7447-7472.
9. European Centre for Disease Prevention and Control, & European Food Safety Authority. (2025, marzo 6). *Prolonged crossborder multiserovar Salmonella outbreak linked to consumption of sprouted seeds: Joint ECDC–EFSA rapid outbreak assessment* (EFSA Supporting Publication 2025: EN9315; ISBN 9789294987822). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2025.EN9315>
10. Centers for Disease Control and Prevention. (2020). *Salmonella*. <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
11. Commissione Europea. (2012). *Regolamento (UE) n. 200/2012 dell'8 marzo 2012 relativo all'obiettivo dell'Unione di riduzione della Salmonella enteritidis e della Salmonella typhimurium nei branchi di polli da carne, come previsto dal regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio*. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 71, 31–36. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32012R0200>
12. Parlamento Europeo e Consiglio. (2004). *Direttiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004 che modifica la direttiva 2001/82/CE relativa al codice comunitario concernente i medicinali veterinari*. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 136, 58–81. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32004L0028>
13. Gaggia F, Mattarelli P and B Biavati. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141: S15-S28.
14. Ricke SC. (2018). Impact of prebiotics on poultry production and food safety. *Yale J. Biol. Med.* 91(2), 151.
15. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94(3), 223-253.
16. Chouhan S, Sharma K and S Guleria. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines* 4(3): 58.
17. Guedes BN, Krambeck K, Durazzo A, Lucarini M, Santini A, Oliveira MBP and EB Souto. (2024). Natural antibiotics against antimicrobial resistance: sources and bioinspired delivery systems. *Braz. J. Microbiol.* 55(3): 2753-2766.
18. Chen J, Wang F, Yin Y and X Ma. (2021). The nutritional applications of garlic (*Allium sativum*) as natural feed additives in animals. *PeerJ* 9: e11934.

19. Cullen SP, Monahan FJ, Callan JJ and JV O'Doherty. (2005). The effect of dietary garlic and rosemary on grower-finisher pig performance and sensory characteristics of pork. *Ir. J. Agric. Food Res.* 57-67.
20. Kim HK. (2016). Garlic supplementation ameliorates UV-induced photoaging in hairless mice by regulating antioxidative activity and MMPs expression. *Molecules* 21(1): 70.
21. Circella E, Casalino G, D'Amico F, Pugliese N, Dimuccio MM, Camarda A and G. Bozzo. (2022). In vitro antimicrobial effectiveness tests using Garlic (*Allium sativum*) against *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Enteritidis*. *Antibiotics* 11(11): 1481.
22. Sallam KI, Raslan MT, Sabala RF, Abd-Elghany SM, Mahros MA and HA Elshebrawy. (2024). Antimicrobial effect of garlic against foodborne pathogens in ground mutton. *Food Microbiol.* 120: 104462.
23. Marefati N, Ghorani V, Shakeri F, Boskabady M, Kianian F, Rezaee R and MH Boskabady. (2021). A review of anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Allium cepa* and its main constituents. *Pharm. Biol.* 59(1): 285-300.
24. Tapiero H, Townsend DM and KD Tew. (2004). Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 58(3): 183-193.
25. Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S and A Patapoutian. (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Current Biol.* 15(10): 929-934.
26. D'Amico F, Casalino G, Dinardo FR, Schiavitto M, Camarda A, Romito D, Bove A and E Circella. (2023). Antimicrobial Efficacy of Phyto-L, Thiosulfonate from *Allium* spp. Containing Supplement, against *Escherichia Coli* Strains from Rabbits. *Vet. Sci.* 10(7): 411.
27. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B and N Gupta. (2015). Comparative evaluation of antibacterial efficacy of six Indian plant extracts against *Streptococcus mutans*. *J. Clin. Diagn. Res.* 9(2): ZC50.
28. Andualem B. (2013). Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3(9): 725-731.
29. Gull I, Saeed M., Shaukat, H., Aslam, S. M., Samra, Z. Q., & Athar, A. M. (2012). Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 11: 1-6.
30. Ghavam M, Bacchetta G, Castangia I and ML Manca. (2022). Evaluation of the composition and antimicrobial activities of essential oils from four species of Lamiaceae Martinov native to Iran. *Sci. Rep.* 12(1), 17044.
31. Mohsenipour Z and M Hassanshahian. (2015). The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. *Jundishapur J. Microbiol.* 8(8): e18971.
32. Ross ZM, O'Gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV and DJ Maslin. (2001). Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 475-480.

33. Choo S, Chin VK, Wong EH, Madhavan P, Tay ST, Yong PVC and PP Chong. (2020). Antimicrobial properties of allicin used alone or in combination with other medications. *Folia Microbiologica* 65: 451-465.
34. Belguith H, Kthiri F, Chati A, Sofah AA, Hamida JB and A Landoulsi. (2010). Study of the effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some *Salmonella* serovars isolates. *Emir. J. Food Agric.* 22(3): 189-206.
35. Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Kumagai H, Seki T and T Ariga. (2008). Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *J. Agric. Food Chem.* 56(11): 4229-4235.
36. Martínez-Díaz E, Martínez-Sánchez JJ, Conesa E, Franco JA and MJ Vicente. (2018). Germination and morpho-phenological traits of *Allium melananthum*, a rare species from south-eastern Spain. *Flora* 249: 16-23.
37. Zhou S, Yan X, Qiao X, Qiu Z, Zhu W, Lu X, Zheng Z and B Zhang. (2025). Evaluate the stability of synthesized allicin and its reactivity with endogenous compounds in garlic. *npj Science of Food* 9(1): 18.

EFFETTI EPATOPROTETTIVI DI SILIBININA E ACIDO CLOROGENICO IN GALLINE ALLEVATE IN GABBIA AFFETTE DA DISORDINI EPATICI DOPO IL PICCO DI PRODUZIONE: DATI PRELIMINARI

Del Zozzo F.¹, Muscatello V.L.², Harper V.³, Fiorini L.³, Archetti L.I.⁴, Serra V.⁵, Carlu C.⁶, Tedesco D.E.A.⁷, Guerrini A.⁷

¹ Chemifarma S.p.a, 47122, Forlì-Cesena (FC), Italia;

² Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;

³ Veterinario Libero Professionista e Zootecnico, 40026, Imola (BO), Italia;

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", 25124, Brescia, Italia;

⁵ Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Università degli Studi di Milano, 26900, Lodi, Italia;

⁶ Phytosynthese, Avenue Jean Jaurès, 63200, Mozac, Francia; ⁷ Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali, Università degli Studi di Milano, Milano (MI), Italia.

Summary

This study was designed to assess the effectiveness of a mixture of *Silybum marianum* L., and *Cynara cardunculus scolymus* L. standardized extract expressed as silibinin (= 2.4 g/L), and chlorogenic acid (= 2.2 g/L) respectively, provided intermittently to caged-laying hens in a commercial farm, to alleviate fatty liver syndromes, improving blood indices and general health. In this study, 792 Lohmann LSL-White hens (41 weeks of age), randomly assigned to 2 replicated groups, control and treated (n = 396 each), were used. The treatment (1 mL/L) was supplied by drinking water every 2 weeks for 7 days, at different time points (T) in a 7-weeks trial. At T0, T3 and T5, 13 hens per group were sampled for blood and serum analysis. At T5, the same hens were sacrificed for organ weight, and liver histological investigations. The treatment improved the hens' health, with an increase in RBC, Hb and HCT blood indices. In treated hens, compared to the control, a reduction of liver weight and serum ALT activity was evidenced, associated with a reduction of liver steatosis cases and severity, evaluated histologically ($P < 0.05$). Other blood and serum indices were not affected by the treatment ($P > 0.05$). This study showed that the phytoextracts administration is useful in improving the liver health of laying hens affected by liver disorders, reducing liver steatosis, associated with an upgrade of main blood indices, after the peak of egg production.

INTRODUZIONE

I programmi di selezione genetica odierni mirano alla creazione di linee genetiche ad alta efficienza alimentare e produttiva che, come nel caso delle galline ovaiole, consentano una massima estensione del ciclo produttivo, associata ad un'elevata produzione di uova (Bain et al., 2016). Queste condizioni favoriscono l'insorgenza di problemi di salute e benessere a causa dell'elevato stress metabolico a cui gli animali sono esposti (Settar et al., 1999), che nel caso delle galline ovaiole si concentrano

primariamente a livello epatico. La steatosi epatica e la sindrome emorragica del fegato grasso (o Fatty Liver Haemorrhagic Syndrome - FLHS) rappresentano le principali patologie epatiche non infettive causate da stress e disordini metabolici; esse sono spesso asintomatiche e associate a mortalità sovente improvvisa, e si osservano frequentemente nelle galline ovaiole allevate in gabbia, durante e dopo il picco di produzione (Trott et al., 2014; Shini et al., 2018; Gretarsson et al., 2023). Numerose prove scientifiche indicano che alcune piante medicinali, come il cardo mariano, *Silybum marianum* L. (Gaertn.), e il carciofo, *Cynara cardunculus scolymus* L. (Hayek), autorizzate come additivi per mangimi e utilizzate con successo anche nel pollame, hanno effetti antiossidanti, epatoprotettivi e epatorigenerativi. Il cardo mariano, una delle principali fonti di silimarina, un complesso di flavonolignani estratto dai suoi semi, di cui la silibina, o silibinina (SIL, 2,3-deidrosilibina) è il composto principale e più attivo, possiede potenti proprietà antiossidanti, epatoprotettive e epatorigenerative ben documentate (Flora et al., 1998; Franz et al., 2007; Saller et al., 2007; Vargas-Mendoza et al., 2014). Nelle galline ovaiole, la silimarina mostra anche effetti ipoglicemici e ipocolesterolemizzanti, riducendo l'attività degli enzimi epatici, AST e ALT in particolare. Analogamente, il carciofo è noto per la sua azione coleretica, diuretica, ipocolesterolemizzante, epatoprotettiva e fonte di sostanze epatostimolanti (Rondanelli et al., 2013; Sahebkar et al., 2018). Questi effetti sono attribuiti principalmente a composti dell'acido caffeilchinico, come l'acido clorogenico (CGA) e la cinarina (Bombardelli et al., 1977), un polifenolo bioattivo, che mostra una forte attività antiossidante con effetti protettivi sulla sopravvivenza cellulare (Kim et al., 2018; Dkhil et al., 2020; Rashidi et al., 2022; Wang et al., 2023) e proprietà ipolipemizzanti (Wang et al., 2012b). Sebbene gli effetti epatoprotettivi dei singoli estratti siano ampiamente noti, i potenziali effetti della loro somministrazione combinata sulla salute del fegato nelle galline ovaiole dopo il picco di produzione, un momento produttivo particolarmente importante dal punto di vista metabolico, sono stati poco studiati. Pertanto, questo studio si è posto l'obiettivo di valutare se questa associazione di estratti standardizzati, silibinina e acido clorogenico, potesse rappresentare una strategia efficace per prevenire il danno epatico e la sindrome del fegato grasso nelle galline ovaiole allevate in gabbia, e come supporto per migliorare gli indici ematici e lo stato di salute dopo il picco di produzione di uova.

MATERIALI E METODI

Parere Comitato Etico

Questo studio è stato autorizzato dall'Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA) dell'Università degli Studi di Milano e dal Ministero della Salute Italiano, con protocollo sperimentale n. 766/2023-PR.

Mangime Complementare Testato

I due fitoestratti, silibinina e acido clorogenico, sono stati somministrati in associazione e in modalità intermittente tramite acqua di bevanda, alla dose di 1 mL/L, contenente estratti standardizzati di: *Silybum marianum* L. (CoE: 551) e carciofo (*Cynara cardunculus scolymus* L., CoE: 565) (Regolamento (CE) n. 1831/2003), espressi rispettivamente come contenuto di silibinina (SIL, = 2,4 g/L) e acido clorogenico (CGA, = 2,2 g/L).

Caratteristiche e Gestione dell'Allevamento

Per lo studio è stato selezionato un allevamento commerciale di galline ovaiole allevate in gabbie arricchite. L'allevamento comprendeva 2 capannoni adiacenti (~36.000 galline/capannone), ugualmente orientati e ugual strutturati. Tutti gli animali sono stati mantenuti in identiche condizioni sperimentali e di allevamento, ed esposti a un programma luce di 16L:8D (20 lux di intensità) per tutto il periodo sperimentale. La linea di distribuzione di acqua e mangime era indipendente tra i 2 capannoni. Per garantire una somministrazione omogenea, continua e *ad libitum* di acqua con il trattamento, è stato utilizzato il sistema Dosatron.

Animali e Disegno Sperimentale

Per lo studio, 792 galline ovaiole Lohmann LSL-White ($1,667 \pm 0,13$ kg/peso corporeo) di 41 settimana di età sono state selezionate casualmente dai 2 capannoni e assegnate a 2 gruppi sperimentali, controllo (C) e trattato (T) ($n=396$ galline/gruppo). Ogni gruppo sperimentale replicato disponeva di 15 gabbie (da 25 a 26 galline/gabbia) identificate casualmente e alternate tra le diverse file e gabbie a piani di ogni capannone. Un totale di 13 galline per gruppo sperimentale (1 gallina/gabbia) sono state identificate casualmente tramite anelli numerati inamovibili, per campionare e valutare sempre gli stessi animali. Il trattamento è stato somministrato in modo intermittente alla dose di 1 mL/L in acqua di bevanda durante 7 settimane di prova, suddivise in 5 punti temporali sperimentali (da T0 a T5), come segue: T0: 1° giorno dall'inizio della 41a settimana, prima dell'inizio del trattamento; T1: 41a settimana (7 giorni), prima somministrazione del trattamento (0,5 mL/L solo il primo giorno del trattamento per abituare gli animali a eventuali variazioni del sapore dell'acqua e non compromettere l'assunzione di acqua e la produzione di uova); T2: dalla 42a alla 43a settimana (14 giorni), primo periodo di sospensione; T3: 44a settimana (7 giorni), seconda somministrazione del trattamento; T4: dalla 45a alla 46a settimana (14 giorni), secondo periodo di sospensione; T5: dalla 47a settimana al primo giorno della 48a settimana di età fino alla fine della prova (7 giorni), terza e ultima somministrazione del trattamento. Al termine della prova (T5), le 13 galline per gruppo sono state sacrificate mediante dislocazione cervicale manuale. Durante il periodo sperimentale, tutte le galline sono state alimentate *ad libitum* con la stessa dieta commerciale. Il tasso di mortalità (%) è stato registrato quotidianamente per ciascun gruppo sperimentale.

Prelievo Ematico

Campioni di sangue (2,5 mL) sono stati effettuati a T0 e T3, dalle stesse 13 galline identificate per gruppo, dalla vena brachiale con siringa sterile (ago 23 G-0,60 mm), mentre alla fine della prova (T5), i campioni di sangue (10 mL) sono stati raccolti tramite taglio della vena giugulare immediatamente dopo la soppressione. Dopo ogni prelievo, un'aliquota di 0,5 mL di campione di sangue è stata posta in provette con K3-EDTA (APTACA, Canelli, Italia) conservata a 5 ± 3 °C e inviata immediatamente al laboratorio per la valutazione degli indici emocromocitometrici (Tabella 1). L'analisi è stata eseguita utilizzando l'analizzatore ematologico automatico, tipo XN-V-1000 (Sysmex, Kobe, Giappone). Eterofili (H, %), linfociti (L, %) e il loro rapporto (H/L) sono stati valutati allestendo strisci ematici per ogni gallina, e colorati con metodo rapido HEMACOLOR (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). La conta è stata

Tabella 1. Effetti del trattamento con silibimina e acido clorogenico sugli indici emocromocitometrici alla 41a settimana di età (primo giorno, T0), alla 44a settimana (T3) e al primo giorno della 48a settimana di età, al termine della sperimentazione (T5). I valori rappresentano la media \pm DS di 13 campioni di sangue per gruppo di trattamento.

Indice	Time point										P-value*
	T0		T3		T5		TRT [†]	T0 vs T5		T3 vs T5	
	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato		T0	T5		
RBC (M/ μ L)	2.16 \pm 0.22	2.29 \pm 0.24	2.27 \pm 0.19	2.51 \pm 0.22	1.96 \pm 0.75	2.25 \pm 0.16	0.006	0.071	0.242	0.007	
Hb (g/dL)	6.29 \pm 0.57	6.66 \pm 0.56	6.48 \pm 0.50	7.09 \pm 0.47	5.66 \pm 2.07 ^a	6.61 \pm 0.35 ^b	0.003	0.194	0.210	0.020	
HCT (%)	24.23 \pm 2.54	25.28 \pm 2.60	24.54 \pm 1.92	26.93 \pm 2.16	21.60 \pm 8.12	24.73 \pm 1.55	0.013	0.315	0.142	0.023	
MCV (fL)	112.17 \pm 2.86	110.35 \pm 5.81	107.99 \pm 3.07	107.11 \pm 3.60	110.62 \pm 3.95	109.20 \pm 2.70	0.124	0.001	0.225	0.037	
MCH (pg)	29.18 \pm 1.38	29.116 \pm 1.95	28.60 \pm 2.12	28.28 \pm 1.88	29.34 \pm 2.28	29.00 \pm 1.78	0.629	0.190	0.997	0.196	
MCHC (g/dL)	26.05 \pm 1.41	26.43 \pm 1.18	26.46 \pm 1.42	26.37 \pm 1.16	26.51 \pm 1.21	26.64 \pm 1.08	0.623	0.619	0.406	0.671	
RDW (%)	8.56 \pm 0.26	8.68 \pm 0.57	9.17 \pm 0.48	9.04 \pm 0.43	8.62 \pm 0.74	8.60 \pm 0.26	0.936	0.000	0.929	0.001	
H (%)	29.40 \pm 7.54	29.30 \pm 7.45	53.27 \pm 12.27	51.16 \pm 10.57	49.75 \pm 5.68	50.00 \pm 12.25	0.761	0.000	0.000	0.454	
L (%)	68.90 \pm 8.96	69.60 \pm 8.34	45.63 \pm 12.11	48.33 \pm 10.62	48.12 \pm 6.44	47.54 \pm 13.40	0.684	0.000	0.000	0.829	
H/L	0.45 \pm 0.18	0.42 \pm 0.15	1.32 \pm 0.55	1.15 \pm 0.54	1.07 \pm 0.30	1.34 \pm 1.19	0.858	0.000	0.000	0.987	

*Le differenze sono state considerate significative per TRT e t a *P < 0,05.

[†]TRT: effetto del trattamento.

s t: effetto tempo.

a, b: I valori sulla stessa riga senza lettere in comune differiscono significativamente (P < 0,05) per l'effetto combinato di TRT ed t (TRT+t), per le differenze evidenziate tra i 2 gruppi sperimentali a ogni punto temporale. L'assenza di lettere o l'uso della stessa lettera indica l'assenza di differenze significative (P > 0,05).

RBC, globuli rossi; Hb, emoglobina; MCH, emoglobina globulare media; MCHC, emoglobina corpuscolare media; HCT, ematocrito; MCV, volume corpuscolare medio; RDW, ampiezza di distribuzione degli eritrociti; H, eterofili; L, linfociti.

eseguita al microscopio ottico da due operatori specializzati indipendenti, contando in totale almeno 100 leucociti in campi diversi su ciascun vetrino. Il rapporto H/L per ciascuna gallina è stato calcolato dividendo il numero di H per il numero di L.

Dall'aliquota di sangue rimanente è stato ottenuto il siero, dopo centrifugazione a 2500 x g a 4 °C per 15 minuti, e successivamente conservata in fiale di plastica da 5 mL a -20 °C fino all'analisi per gli indici biochimici (Tabella 2). Tali parametri sono stati valutati spettrofotometricamente con un analizzatore biochimico multiparametro ILab 650 (Instrumentation Laboratory, Werfen Company, Milano, Italia), utilizzando kit commerciali forniti dallo stesso produttore.

Valutazione Necroscopica e Campionamento degli Organi

Al termine della prova, le 13 galline sacrificate per gruppo sono state sottoposte ad esame autoptico per definire lo stato di salute e la presenza di eventuali lesioni patologiche, con particolare attenzione alle condizioni del fegato. La cavità celomatica è stata aperta dopo la soppressione e l'intero tratto gastrointestinale (stomaco, ventriglio, intestino), pancreas e fegato rimossi, pesati, e il fegato valutato secondo i seguenti metodi. Il colore del fegato e il punteggio delle lesioni macroscopiche sono stati valutati seguendo il metodo illustrato da Choi e colleghi (2012) e Diaz e colleghi (1999). In breve, ogni fegato è stato valutato visivamente rispetto al colore (variazione della tonalità di giallo, come indice di accumulo lipidico), e sua intensità, assegnando un punteggio al colore del parenchima da 1 a 5, come segue: 1 = colore del fegato normale; da 2 a 5 (da rosso scuro a rosso giallastro chiaro), dove è stato attribuito anche il punteggio massimo (score 5) in caso di fegati color stucco e steatosi epatica grave. L'eventuale presenza di emorragie epatiche è stata valutata applicando uno score da 0 a 5, come segue: 0 = fegato normale; 1 = fino a 10 emorragie petecchiali sottocapsulari o ecchimotiche; 2 = più di 10 emorragie petecchiali sottocapsulari o ecchimotiche; da 3 a 5 = emorragie grandi e massive. Il conteggio e valutazione delle emorragie parenchimali, è stato eseguito anche a fegato rimosso, osservando l'organo all'interno e all'esterno dei rispettivi lobi (superiore e inferiore). I risultati della valutazione sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS) di 3 punteggi assegnati a ciascun fegato per ciascun gruppo di trattamento, forniti da 3 diversi operatori indipendenti qualificati. Successivamente, sezioni di fegato di 2x2 cm prelevati da ciascuna gallina sono state tagliate e immediatamente fissate in formalina tamponata al 10% per la successiva valutazione istologica.

Istopatologia

I campioni di fegato prelevati dalle 13 galline per gruppo fissati in formalina, sono stati processati secondo procedure di routine, e colorati con ematossilina ed eosina (H&E), secondo le procedure di routine. Tutti i campioni di tessuto sono stati valutati in cieco per la presenza di steatosi epatica ed emorragie, caratteristiche istopatologiche della sindrome emorragica del fegato grasso (Gao et al., 2019). La gravità della steatosi è stata valutata qualitativamente con una classificazione a 4 livelli secondo Trott e colleghi (2014): 0 (vacuolizzazione assente o molto rara); 1 (< 50% di epatociti contenenti vacuoli di qualsiasi dimensione); 2 (50% di epatociti contenenti vacuoli di qualsiasi dimensione); 3 (> 50% di epatociti contenenti vacuoli da medi a grandi). Qualsiasi ulteriore riscontro patologico è stato registrato e descritto.

Tabella 2. Effetti del trattamento con silibina e acido clorogenico sugli indici biochimici sierici alla 41a settimana di età (primo giorno, T0), alla 44a settimana (T3) e al primo giorno della 48a settimana di età, al termine della sperimentazione (T5). I valori rappresentano la media \pm DS di 13 campioni di siero per gruppo di trattamento.

Item	Time point										P-value*
	T0		T3		T5		TRT ^c	T0 vs T5	T3 vs T5	f ^d	
	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato	Controllo	Trattato					
Glu (mmol/L)	13.17 \pm 0.63	13.10 \pm 0.59	12.44 \pm 1.04	12.57 \pm 0.87	14.11 \pm 0.45	13.67 \pm 1.07	0.497	0.007	0.001	0.000	
UA (μ mol/L)	275.30 \pm 45.18	259.61 \pm 44.81	221.23 \pm 42.08	200.61 \pm 47.03	267.23 \pm 57.42	258.07 \pm 51.50	0.164	0.000	0.715	0.000	
AST (U/L)	163.08 \pm 18.32	162.92 \pm 15.06	180.53 \pm 30.30	182.46 \pm 18.39	200.15 \pm 64.1	197.92 \pm 43.97	0.985	0.070	0.001	0.082	
ALT (U/L)	8.91 \pm 2.57	8.00 \pm 2.16	13.00 \pm 2.48 ^a	9.66 \pm 3.31 ^b	7.00 \pm 2.19 ^a	5.92 \pm 1.38 ^b	0.004	0.000	0.004	0.000	
ALP (U/L)	367.91 \pm 138.8	383.75 \pm 78.61	534.15 \pm 268.06	522.84 \pm 203.7	546.23 \pm 216.84	475.58 \pm 203.39	0.620	0.001	0.017	0.761	
Bil (μ mol/L)	1.32 \pm 1.11	1.47 \pm 1.69	1.92 \pm 1.51	1.25 \pm 1.13	2.35 \pm 1.26	2.17 \pm 0.70	0.359	0.529	0.009	0.031	
TG (mmol/L)	21.90 \pm 8.54	21.32 \pm 6.10	24.44 \pm 8.23	24.14 \pm 7.76	25.08 \pm 9.29	25.72 \pm 8.55	0.971	0.241	0.118	0.620	
CL (mmol/L)	3.75 \pm 1.61	4.20 \pm 1.62	4.41 \pm 1.53	4.33 \pm 1.38	4.50 \pm 1.82	4.46 \pm 1.73	0.756	0.373	0.293	0.818	
HDL-CL (mmol/dL)	0.28 \pm 0.08	0.31 \pm 0.06	0.26 \pm 0.18	0.28 \pm 0.09	0.43 \pm 0.07	0.43 \pm 0.10	0.556	0.504	0.000	0.000	

*Le differenze sono state considerate significative per TRT e t a *P < 0,05.

^cTRT: effetto del trattamento.

^df: effetto tempo.

^{a, b}: I valori sulla stessa riga, senza lettere in comune, differiscono significativamente (P < 0,05) per l'effetto combinato di TRT e t (TRT+t), per le differenze evidenziate tra i 2 gruppi sperimentali a ogni punto temporale. L'assenza di lettere o l'uso della stessa lettera indicano una differenza non significativa (P > 0,05).

Glu, glucosio; UA, acido urico; ALT, alanina aminotransferasi; AST, aspartato aminotransferasi; ALP, fosfatasi alcalina; Bil, bilirubina; CL, colesterolo; HDL-CL, colesterolo HDL; TG, trigliceridi.

Analisi Statistica dei Dati

I risultati dei dati ottenuti sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Il software statistico STATA-Statistical Software Package (StataCorp, College Station, TX, USA) versione 16 (StataCorp, 2016), è stato utilizzato per l'analisi dei dati. In precedenza, la distribuzione di normalità dei dati è stata verificata mediante il test di Shapiro-Wilk. È stato eseguito un test MANOVA a misure ripetute, seguito dal test post hoc di Duncan per valutare la significatività del trattamento (TRT), del tempo (t) e del loro effetto combinato (TRT+t) a ciascun punto temporale dello studio. Il primo dei due modelli stimati includeva gli effetti di TRT e t, mentre il secondo il loro effetto combinato, per evitare problemi di multicollinearità. Nei casi in cui l'ipotesi di una distribuzione dei dati normale non è stata rispettata, è stato eseguito il test non parametrico di Kruskal-Wallis. Per tutti i test, la significatività statistica è stata impostata a $P < 0,05$.

RISULTATI

Osservazioni Generali

Dopo e durante la somministrazione del trattamento, non sono stati osservati effetti avversi nelle galline ovaiole per tutto il periodo sperimentale, come dimostrato anche dagli indici biochimici sierici, a conferma della sicurezza del trattamento alle dosi testate. L'appetibilità dell'acqua dopo la miscelazione del prodotto non è stata alterata. Non sono stati osservati episodi di parassitismo, pica o cannibalismo. Non è stata osservata mortalità in entrambi i gruppi sperimentali per tutta la durata del periodo sperimentale.

Indici Emocromocitometrici

Durante la sperimentazione, l'effetto di TRT, t e i loro effetti combinati hanno mostrato differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) (Tabella 1). Le analisi hanno evidenziato che nelle galline trattate, il TRT influisce direttamente sul contenuto di RBC e Hb, con una conseguente influenza positiva sull'HCT ($P < 0,05$), rispetto al gruppo controllo. L'Hb, al termine della prova (T5) dopo l'ultima somministrazione del trattamento, ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, per l'effetto TRT+t ($P < 0,05$), dove le galline trattate hanno mostrato un contenuto di Hb più elevato rispetto alle galline di controllo. Tuttavia, indici correlati come MCV, MCH, MCHC e RDW non sono stati influenzati da TRT ($P > 0,05$). Per l'effetto t, RBC, Hb e HCT hanno mostrato differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) da T3 a T5 (fine della prova), come riportato in Tabella 1. Eterofili, linfociti e loro rapporto (H/L) non sono stati influenzati da TRT o dall'effetto di combinazione TRT+t ($P > 0,05$).

Indici Biochimici Sierici

La Tabella 2 riporta i risultati delle analisi biochimiche sieriche del profilo metabolico delle galline. Il trattamento non ha alterato l'intervallo fisiologico degli indici biochimici sierici. Tuttavia, le galline trattate hanno mostrato una riduzione dell'enzima ALT rispetto al gruppo controllo ($P < 0,05$). Sono state rilevate differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) in corrispondenza dei differenti tempi di rilevazione per gli effetti di t e TRT+t. Glu e UA sierici non sono stati influenzati da TRT né dagli effetti TRT+t ($P > 0,05$). Ciononostante, l'effetto t ha mostrato una riduzione significativa dei livelli di Glu e UA a T3 (alla fine del primo periodo di sospensione), rispetto agli altri tempi di rilevazione sperimentali ($P < 0,05$) per entrambi i gruppi di trattamento. Gli enzimi epatici AST e ALP non sono stati influenzati direttamente da TRT ($P > 0,05$),

mentre ALT è stato influenzato positivamente da TRT, che ne ha ridotto i livelli nelle galline trattate da T0 a T5, rispetto al gruppo di controllo ($P < 0,05$). È stata rilevata una differenza statisticamente significativa per l'effetto TRT+t a T3 e T5 tra i due gruppi ($P < 0,05$). È stato osservato un aumento degli effetti t da T0 a T5 in entrambi i gruppi per l'enzima ALP e il contenuto totale di Bil ($P < 0,05$). TG e CL sierici non sono stati influenzati dagli effetti TRT, t e TRT+t ($P > 0,05$). Il colesterolo HDL-CL è stato influenzato da t ($P > 0,05$) in entrambi i gruppi, dove il livello di HDL-CL è migliorato significativamente ($P < 0,05$).

Peso Organi

I dati relativi al peso dei diversi organi sono riportati nella Tabella 3. Le galline trattate mostravano, al termine della prova (T5), un peso del tratto gastrointestinale più elevato rispetto al controllo, sebbene non significativamente ($P > 0,05$). Il fegato delle galline trattate, inoltre, era di peso significativamente inferiore ($P < 0,05$).

Valutazioni delle Lesioni Macroscopiche del Fegato e Valutazioni Istologiche

All'autopsia, non sono state osservate lesioni patologiche macroscopiche a livello di cuore, polmoni e tratto gastrointestinale, inclusi casi di enterite, ovaio e ovidotto. Successivamente, il fegato di ciascuna gallina è stato rimosso e pesato. I punteggi relativi al colore del fegato e alle lesioni emorragiche ottenuti durante l'autopsia sono riportati nella Figura 1, come esempi rappresentativi di entrambi i gruppi di trattamento. Le immagini dei reperti anatomopatologici mostrano che il fegato di tutte le galline del gruppo controllo e trattato era aumentato di volume rispetto all'anatomia normale (sebbene il fegato delle galline trattate mostrasse un peso significativamente inferiore), mediamente liscio, lucido e di colore giallo più o meno intenso. Nessun fegato corrispondeva al colore di un fegato fisiologicamente normale, come marrone scuro e lucido (Figura 1Ca-Td). Macroscopicamente, ciascuna gallina mostrava casi sospetti di steatosi epatica conclamata o FLHS, più o meno gravi. Tuttavia, le galline del gruppo controllo hanno mostrato, globalmente, una colorazione giallo-arancio significativamente intensa e uniforme, rispetto alle galline trattate (Figura 1Ta-Td), che presentavano un punteggio di colore del parenchima giallo-marrone chiaro ($P < 0,05$, Tabella 3), con emorragie e friabilità. Infatti, i fegati delle galline del gruppo controllo presentavano un'elevata tendenza del parenchima a causare rotture al tatto, quindi maggiore friabilità (Figura 1Ca-Cb, 1Cd, cerchio nero). Sebbene non sia stata registrata alcuna significativa emorragia epatica grave in nessuno dei due gruppi, in 6 delle 13 galline di controllo il fegato presentava ematomi sottocapsulari localmente estesi (Figura 1Cb, 2Cd, freccia bianca) o disseminati a petecchie o emorragie multifocali (Figura 1Ca-2Cd, freccia bianca), mentre le galline trattate presentavano un punteggio inferiore di emorragie ($P > 0,05$) (Figura 1Ta, 2Tc). Dai risultati istologici, sono stati confermati i casi di sospetta steatosi o FLHS. Sono state osservate alterazioni epatocellulari sia nelle galline di controllo che in quelle trattate. La steatosi epatica, caratterizzata istologicamente da micro- e macro-vacuoli citoplasmatici otticamente vuoti, era significativamente presente nelle galline di controllo (12 su 13) di gravità da lieve a moderata ($P > 0,05$), rispetto alle galline trattate. Nelle galline trattate, era presente steatosi epatica con vacuolizzazione epatocitaria di entità lieve (8 su 13 galline), mentre 5 galline non presentavano steatosi. Nel gruppo di controllo, 2 casi presentavano localmente emorragie sottocapsulari estese (numerosi eritrociti stravasati) indicative di FLHS. Come ulteriore riscontro, è stata riscontrata una colangioepatite cronica linfoplasmacitaria da lieve a moderata in tutti i campioni analizzati.

Tabella 3. Effetti del trattamento con silibinina e acido clorogenico sul peso degli organi, sulla valutazione macroscopica e istologica del fegato al termine della sperimentazione (T5). I valori rappresentano la media \pm DS di 13 campioni di organi prelevati dalle 13 galline per gruppo di trattamento.

Parametro valutato	Gruppo		<i>P-value*</i>
	Controllo	Trattato	
Peso tratto gastrointestinale (g)	150.00 \pm 14.15	155.41 \pm 15.15	0.233
Peso fegato (g)	44.61 \pm 6.97 ^a	39.91 \pm 3.62 ^b	0.031
Score colore fegato (1-5 ^o)	2.34 \pm 0.88 ^a	1.46 \pm 0.51 ^b	0.004
Score presenza e grado di emorragie epatiche (1-5 ^{&})	1.15 \pm 0.85	0.61 \pm 0.65	0.136
Score valutazione istologica steatosi (0-3 [‡])	1.92 \pm 0.90 ^a	0.84 \pm 0.75 ^b	0.003

! TRT: effetto del trattamento.

*Le differenze sono state considerate significative con $P < 0,05$.

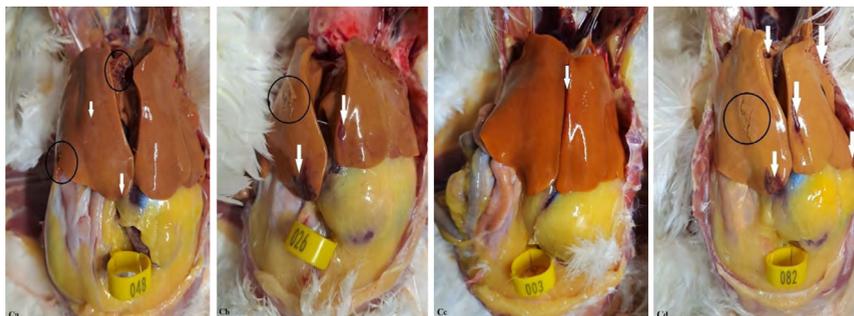
^{a,b}: I valori in una riga senza lettere in comune differiscono significativamente ($P < 0,05$). L'assenza di lettere o l'uso della stessa lettera non indicano alcuna differenza significativa ($P > 0,05$).

^o Punteggio del colore del parenchima da 1 a 5, come segue: punteggio 1 = colore del fegato normale; punteggio da 2 a 5 (da rosso scuro a rosso giallastro chiaro), dove il punteggio massimo (punteggio 5) è stato attribuito anche in caso di fegati di colore mastice e steatosi epatica grave.

[&]L'emorragia epatica è stata valutata da 0 a 5, con: punteggio 0 = fegato normale; punteggio da 1 = a 10 per emorragie petecchiali o ecchimotiche sottocapsulari; punteggio 2 = 2 o più di 10 emorragie petecchiali o ecchimotiche sottocapsulari; Punteggio da 3 a 5 = emorragie estese e massive.

[‡] La gravità della steatosi (valutazione istologica) è stata valutata qualitativamente con una classificazione a 4 livelli, secondo Trott e colleghi (2014): 0 (vacuolizzazione assente o molto rara), 1 (<50% di epatociti contenenti vacuoli di qualsiasi dimensione), 2 (50% di epatociti contenenti vacuoli di qualsiasi dimensione) e 3 (>50% di epatociti contenenti vacuoli da medi a grandi).

Figura 1. Score delle lesioni epatiche, emorragiche e valutazione istologica, osservate a fine trial (T5), nel gruppo controllo (C) e trattato (T).



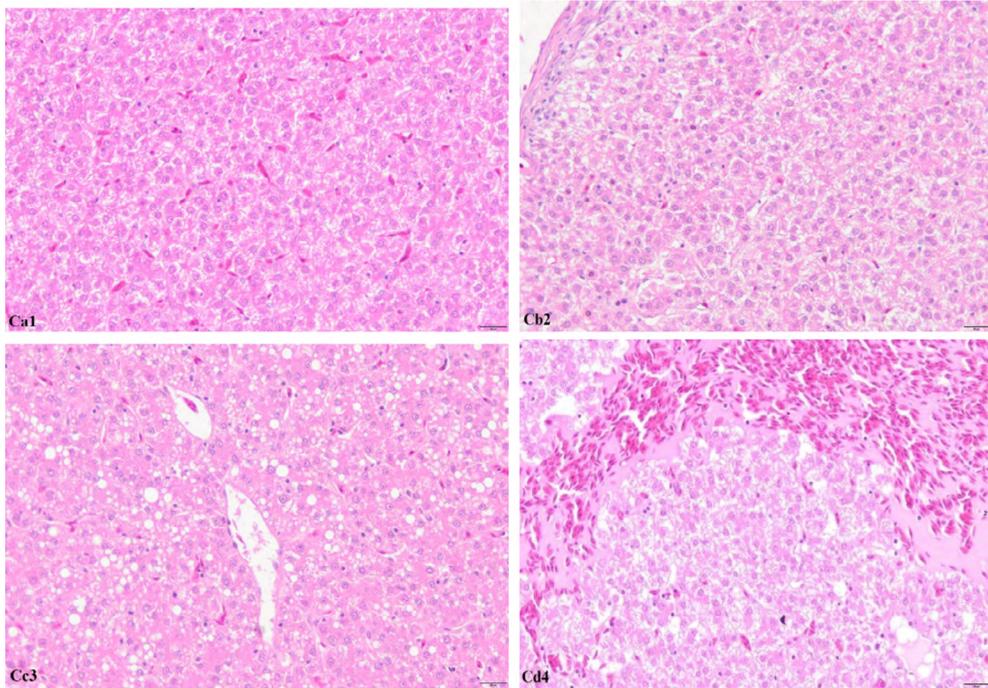


Figura Ca. Punteggio di steatosi 2, punteggio emorragico 1 (anello 048). Epatomegalia moderata, con parenchima discolorato, marrone chiaro lucido, morbido e friabile, facilmente fragile (cerchio nero), con presenza di alcune petecchie emorragiche (freccia bianca). **Figura Cb.** Punteggio di steatosi 2, punteggio emorragico 2 (anello 026). Epatomegalia moderata, con parenchima discolorato, di colore marrone chiaro lucido, molle e friabile, facilmente frangibile (cerchio nero), con presenza di 2 ematomi nella parte apicale dei lobi epatici (freccia bianca). Presenza di piccole petecchie emorragiche diffuse ai margini dei lobi. **Figura Cc.** Punteggio di steatosi 1-2, emorragico 1 (anello 003). Epatomegalia moderata, con parenchima di colore arancio scuro, compatto e lucido, con presenza di una singola petecchia emorragica al margine del lobo epatico (freccia bianca). **Figura Cd.** Punteggio di steatosi 4, emorragico 3 (anello 082). Epatomegalia moderata, con parenchima di colore giallo ocre, molle e friabile, facilmente frangibile (cerchio nero), con presenza di 3 ematomi (freccia bianca) e diverse petecchie emorragiche. **Figura Ca1.** Punteggio 1 (anello 048): epatociti contenenti piccoli vacuoli citoplasmatici otticamente vuoti (H&E, 200x). **Figura Cb2.** Punteggio 2 (anello 026): rigonfiamento degli epatociti dovuto alla presenza di vacuoli piccoli e medi otticamente vuoti (H&E, 200x). **Figura Cc3.** Punteggio 3 (anello 003): rigonfiamento diffuso degli epatociti dovuto alla presenza di vacuoli grandi e medi (H&E, 200x). **Figura Cd4.** Punteggio 3 (anello 082): alterazione diffusa degli epatociti contenenti vacuoli citoplasmatici di medie dimensioni, confluenti e otticamente vuoti. Un'emorragia sottocapsulare (numerosi eritrociti stravasati) è presente nella parte superiore dell'immagine (H&E, 200x).

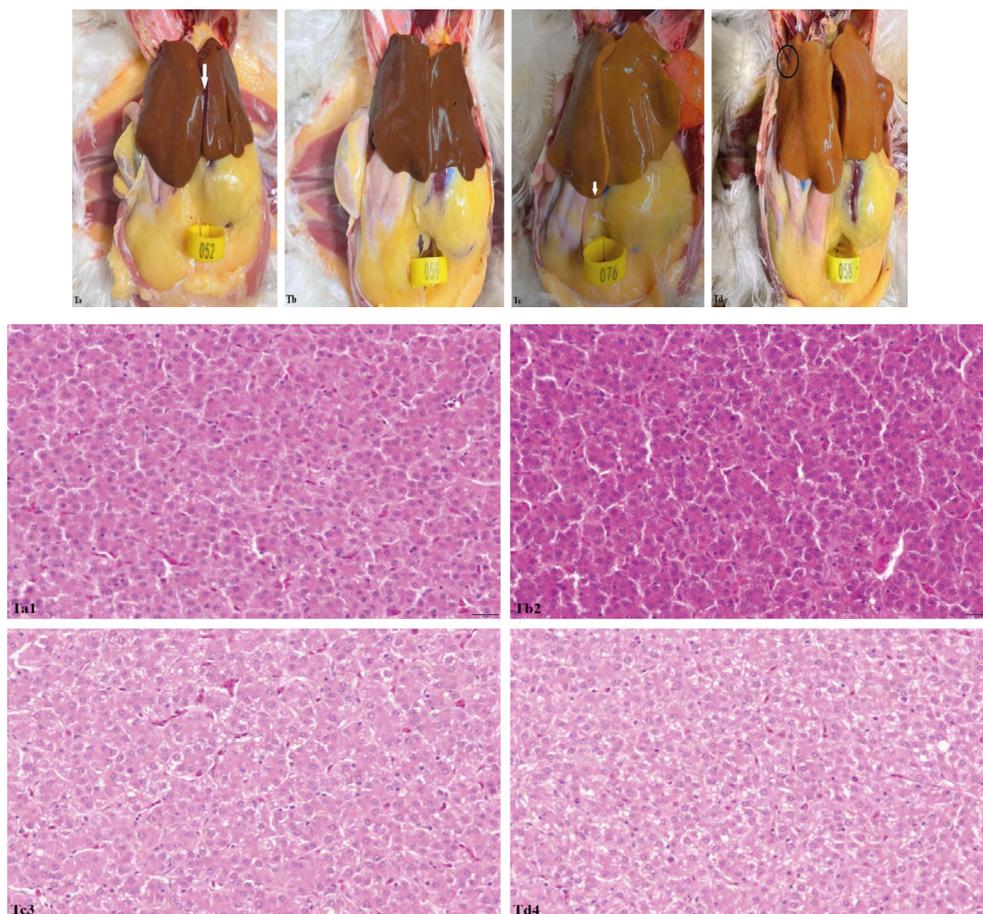


Figura Ta. Punteggio di steatosi 1, punteggio emorragico 1 (anello 052). Epatomegalia lieve, con parenchima bruno leggermente decolorato, lucido ma non friabile, con presenza di una sola petecchia emorragica al margine del lobo (freccia bianca). **Figura Tb.** Punteggio di steatosi 1, punteggio emorragico 0 (anello 059). Epatomegalia lieve, con parenchima bruno leggermente decolorato, lucido ma non friabile. Assenza di emorragie. **Figura Tc.** Punteggio di steatosi 1/2, punteggio emorragico 1 (anello 076). Epatomegalia moderata, con parenchima tendente al giallo scuro, ma non friabile, compatto e lucido, con presenza di una sola petecchia emorragica al margine del lobo epatico (freccia bianca). **Figura Td.** Punteggio di steatosi 2, punteggio emorragico 0 (anello 058). Epatomegalia moderata, con parenchima giallo ocra scuro, lucido, con lieve friabilità dei margini dei lobi (cerchio nero). Assenza di emorragie. **Figura Ta1.** Punteggio 0 (anello 052): nessuna vacuolizzazione epatocitaria (H&E, 200x). **Figura Tb2.** Punteggio 0 (anello 059): nessuna vacuolizzazione epatocitaria (H&E, 200x). **Figura Tc3.** Punteggio 1 (anello 076): presenza di microvacuolizzazioni citoplasmatiche otticamente vuote in parte degli epatociti (H&E, 200x). **Figura Td4.** Punteggio 2 (anello 058): presenza di vacuoli otticamente di medie dimensioni in parte degli epatociti (H&E, 200x).

DISCUSSIONE

Il monitoraggio degli indici ematologici nelle galline ovaiole durante il ciclo produttivo è utile per individuare patologie come la steatosi epatica (FLHS) e valutare lo stato di salute, soprattutto nelle fasi critiche della produzione, come il picco e il suo mantenimento, che richiedono un imponente sforzo metabolico (Etim et al., 2014). L'utilizzo di specifici composti bioattivi che agiscono migliorando e supportando la funzionalità epatica potrebbe rappresentare tecnicamente un'opzione valida e vantaggiosa. Nel nostro studio, sebbene le galline di entrambi i gruppi presentassero lesioni macroscopiche e istologiche di gravità variabile, compatibili con casi di steatosi conclamata, l'ematologia ha rivelato effetti significativi della somministrazione intermittente e combinata di SIL e CGA, con un aumento degli indici RBC, Hb e HCT durante le 7 settimane di prova, suggerendo una migliore risposta fisiologica nelle galline trattate. Uno studio precedente ha riportato effetti simili della somministrazione di silimarina, che ha migliorato gli indici RBC, Hb e HCT nei polli da carne (Abdalla et al., 2018), probabilmente grazie alla sua attività antiossidante, anche a livello di membrana cellulare. La SIL può prevenire l'emolisi dei globuli rossi grazie alla stabilizzazione della membrana cellulare eritrocitaria, come dimostrato anche in modelli animali esposti a generatori di radicali (Karimi et al., 2006; Psotová et al., 2004). Grazie alla protezione della membrana cellulare dei globuli rossi, quindi, il complesso di silimarina può agire efficacemente nel prevenire la polimerizzazione dell'Hb, con un conseguente miglioramento dell'apporto di ossigeno ai tessuti (Adhikari et al., 2016; Soltanian et al., 2020), migliorando il benessere delle galline. Bonarska-Kujawa e colleghi (2015) hanno riportato che anche CGA, grazie alle sue caratteristiche idrofile, ha un'elevata capacità di modificare la regione idrofila della membrana eritrocitaria, proteggendo la membrana dall'ossidazione indotta dai radicali liberi in un mezzo acquoso, come il sangue, evitando la polimerizzazione dell'Hb. Effetti sul miglioramento del contenuto di Hb sono stati riportati anche in topi diabetici, sottoposti a supplementazione di CGA alla dose di 5 mg/kg di peso corporeo (Karthikesan et al., 2010). L'incremento di RBC, Hb e HCT osservato nel gruppo trattato, in presenza di valori di VCM e RDW entro i limiti fisiologici in entrambi i gruppi, non evidenzia segni compatibili con anemia o disfunzioni ematologiche/coagulopatiche. Inoltre, alla dose somministrata, l'associazione di fitoestratti somministrata in modo intermittente non ha mostrato effetti significativi sull'andamento delle serie leucocitarie, comprese le concentrazioni di H, L, e il relativo rapporto H/L.

Nelle galline trattate, in associazione a un miglioramento di alcuni indici ematici, sono stati osservati alcuni effetti sull'andamento degli enzimi epatici. Normalmente, in caso di danno epatico, l'attività degli enzimi ALT e AST nel siero tende ad essere elevata (Yousefi et al., 2005). Nel presente studio, i risultati hanno mostrato che l'attività degli enzimi AST e ALP non è stata influenzata dal trattamento, rimanendo entro i range fisiologici (Board et al., 2018; Hong et al., 2021). Al contrario, l'enzima ALT è risultato significativamente ridotto dopo il trattamento. Considerando le tre diverse somministrazioni alternate a periodi di sospensione, lo studio suggerisce che l'effetto dei fitoestratti si mantiene parzialmente anche durante il periodo di sospensione, come osservato al T3 dello studio. Uno dei principali target d'azione degli estratti testati è l'attività epatoprotettiva e coleretica. Studi recenti hanno riportato che la somministrazione di silimarina e CGA (SIL compresa tra 250 e

1.000 mg/kg di dieta; CGA compresa tra 600 e 800 mg/kg di dieta), nelle galline ovaiole, riduce l'attività ALT e AST sierica (Guo et al., 2024; Zhao et al., 2024), mostrando effetti epatoprotettivi e alleviando le lesioni epatiche nelle galline con FLHS o steatosi, come osservato in questo studio. Tuttavia, anche a dosi inferiori e nonostante la scarsa biodisponibilità che caratterizza questi fitoestratti (Morazzoni et al., 1992; Di Costanzo e Angelico, 2019; Lu et al., 2020), la somministrazione della miscela di SIL e CGA mostra un'azione epatoprotettiva, che successivamente porta a cambiamenti positivi nell'istologia del tessuto epatico, come riportato dai risultati istologici, correlati a una diminuzione di peso del fegato. Specificatamente, si osserva un peso del fegato più elevato nelle galline con steatosi o affette da FLHS, come nelle galline di controllo, a causa dell'eccessivo accumulo di lipidi epatici; di conseguenza, i diversi score di colore assegnati sono direttamente correlati con il contenuto di lipidi epatici stoccati. Tuttavia, rispetto a quanto riscontrato nelle galline di controllo e trattate durante l'ispezione macroscopica dei fegati, il punteggio di colore attribuito, così come la presenza di emorragie parenchimali, non erano significativamente diversi, suggerendo un identico danno epatico. L'indagine istologica, invece, ha rimodulato tale visione, confermando che le galline trattate presentavano invece una migliore condizione epatica rispetto alle galline di controllo, con nessun caso di FLHS (5 galline senza steatosi e 8 con casi molto lievi di steatosi). Casi di FLHS e steatosi moderata o grave sono stati riscontrati esclusivamente nel gruppo di controllo. Le alterazioni istopatologiche suggeriscono che entrambi i gruppi sperimentali fossero già affetti da disturbi epatici prima dell'inizio della somministrazione dei fitoestratti. Tuttavia, nelle galline trattate il fitocomplesso ha mostrato effetti benefici, attenuando la gravità della steatosi e riducendo significativamente il peso epatico. Nel complesso, considerando il punteggio macroscopico della steatosi rispetto al punteggio assegnato durante la valutazione istologica, si deve considerare che la valutazione anatomopatologica/ispettiva del fegato non seguita da un esame istologico è insufficiente per una valutazione corretta e completa delle effettive condizioni epatiche delle galline ovaiole. Come ulteriore riscontro, è stata rilevata una colangioepatite cronica linfoplasmacitaria da lieve a moderata in tutti i fegati analizzati, indipendentemente dal trattamento. L'epatite portale e/o la colangioepatite sono reperti di routine dell'infiammazione cronica del tessuto epatico nelle categorie avicole ad alta produzione, così come nei polli da carne (Guerrini et al., 2024).

CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia che l'associazione di silibinina e acido clorogenico possono a tutti gli effetti essere proposti come promettente strategia di supporto alimentare naturale per prevenire la progressione e l'aggravamento di diverse malattie epatiche croniche come steatosi epatica e FLHS, riducendo il danno epatico nelle galline ovaiole dopo il picco di produzione. Lo studio dimostra che, alla dose testata, la somministrazione intermittente di silibinina e acido clorogenico in galline ovaiole in gabbia affette da steatosi/FLHS migliora la salute del fegato, associato a una riduzione dell'enzima ALT, a un peso del fegato inferiore e a un miglioramento di alcuni indici ematici essenziali, come globuli rossi e emoglobina, con una probabile migliore ossigenazione tissutale e della salute generale delle galline. Non di meno, lo studio suggerisce che per una corretta diagnosi di steatosi epatica o FLHS, l'indagine

istologica è essenziale, poiché l'autopsia e l'esame macroscopico del fegato da soli non sono sempre affidabili. Per una migliore comprensione di questi meccanismi fisiologici, del ruolo dello stress ossidativo e della risposta infiammatoria nelle galline ovaiole supplementare con silibinina e associazione di acido clorogenico, saranno necessarie ulteriori indagini.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdalla AA, Abou-Shehema BM, Rawia SH and RE Marwa. (2018). Effect of silymarin supplementation on the performance of developed chickens under summer conditions 1-during growth period. *Egypt. Poult. Sci.* 38: 305-329.
2. Adhikari M and R Arora. (2016). The flavonolignan-silymarin protects enzymatic, hematological, and immune system against γ -radiation-induced toxicity. *Environ Toxicol.* 31: 641-654.
3. Bain M, Nys Y and I. Dunn. (2016). Increasing persistency in lay and stabilising egg quality in longer laying cycles. What are the challenges? *Br. Poult. Sci.* 57: 330-338.
4. Board MM, Crespo R, Shah DH and CM Faux. (2018). Biochemical reference intervals for backyard hens. *J. Avian Med. Surg.* 32: 301-306.
5. Bombardelli E, Gabetta B and EM Martinelli. (1977). Gas-liquid chromatographic and mass spectrometric investigation on *Cynara scolymus* extracts. *Fitoterapia* 48: 143-152.
6. Bonarska-Kujawa D, Cyboran-Mikołajczyk S and H Kleszczyńska. (2015). Molecular mechanism of action of chlorogenic acid on erythrocyte and lipid membranes. *Mol. Membr. Biol.* 32: 46-54.
7. Choi YI, Ahn HJ, Lee BK, Oh ST, An BK and CW Kang. (2012). Nutritional and hormonal induction of fatty liver syndrome and effects of dietary lipotropic factors in egg-type male chicks. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 25: 1145-1152.
8. Di Costanzo A and R Angelico. (2019). Formulation strategies for enhancing the bioavailability of silymarin: The state of the art. *Molecules* 24: 2155.
9. Diaz GJ, Squires EJ and RJ Julian. (1999). The use of selected plasma enzyme activities for the diagnosis of fatty liver hemorrhagic syndrome in laying hens. *Avian Dis.* 43: 768-773.
10. Dkhil MA, Abdel Moneim AE, Bauomy AA, Khalil M, Al-Shaebi EM and S Al-Quraishy. (2020). Chlorogenic acid prevents hepatotoxicity in arsenic-treated mice: Role of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Biol. Rep.* 47: 1161-1171.
11. Etim NN, Williams ME, Akpabio U and EE Offiong. (2014). Haematological parameters and factors affecting their values. *Agric. Sci.* 2: 37-47.
12. Flora K, Hahn M, Rosen H and K Benner. (1998). Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93: 139-143.
13. Franz Ch, Bauer R, Carle R, Tedesco D, Tubaro A and K Zitterl-Eglseer. (2007). Study on the assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as 'additives' for use in animal production. *EFSA Supporting Publications* 4: 070828.
14. Gao X, Liu P, Wu C, Wang T, Liu G, Cao H, Zhang C, Hu G and X Guo. (2019). Effects of fatty liver hemorrhagic syndrome on the AMP-activated protein kinase signalling pathway in laying hens. *Poult. Sci.* 98: 2201-2210.
15. Gretarsson P, Kittelsen K, Moe RO, Vasdal G and I Toftaker. (2023). End of lay

- postmortem findings in aviary housed laying hens. *Poult Sci.* 102: 102332.
16. Guerrini A, Salaroli R, Zannoni A, Avallone G, Leone F, Serra V, Quaglia G, Del Zozzo F, Chabrilat T, Carlu C, Lupini C and DEA Tedesco. (2025). Immunomodulatory and anti-inflammatory potential of botanicals bioactive product (Phyto ax'cell™) for an improvement of the well-being of laying hens at the peak of production. *Poult. Sci.* 104882.
 17. Guo Y, Xu Y, Wang D, Shihao Y, Zehe S, Rui L and X He. (2024). Dietary silymarin improves performance by altering hepatic lipid metabolism and cecal microbiota function and its metabolites in late laying hens. *J. Animal Sci. Biotechnol.* 15: 100.
 18. Hong D, Liyun C, Fuwei LI, Qiaoxian Y, Dehe W, Rongyan Z and C Hui. (2021). Research Note: Effect of age on hematological parameter and reference intervals for commercial Lohmann silver layer. *Poult. Sci.* 100(12):101497.
 19. Karimi GH, Hassanzadeh M and S Mehri. (2006). Protective effects of Silymarin against free radical-induced erythrocyte lysis. *J. Alternat. Complement. Med.* 3.
 20. Karthikesan K, Pari L and VP Menon. (2010). Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Gen. Physiol. Biophys.* 29: 23-30.
 21. Kim H, Pan JH, Kim SH, Lee JH and JW Park. (2018). Chlorogenic acid ameliorates alcohol-induced liver injuries through scavenging reactive oxygen species. *Biochimie* 150: 131-138.
 22. Lu H, Tian Z, Cui Y, Liu Z and X Ma. (2020). Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19: 3130-3158.
 23. Morazzoni P, Magistretti MJ, Giachetti C and G Zanolo. (1992). Comparative bioavailability of silipide, a new flavanolignan complex, in rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 17: 39-44.
 24. Psotová J, Chlopčiková S, Miketová P, Hrbáč J and V Šimánek. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. part III. apigenin, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin. *Phytother. Res.* 18: 516-521.
 25. Rashidi R, Rezaee R, Shakeri A, Hayes AW and G Karimi. (2022). A review of the protective effects of chlorogenic acid against different chemicals. *J. Food Biochem.* 46, e14254.
 26. Regolamento (CE) N. 1831/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN>
 27. Rondanelli M, Monteferrario F, Perna S, Faliva MA and A Opizzi. (2013). Health-promoting properties of artichoke in preventing cardiovascular disease by its lipidic and glycemic-reducing action. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 80: 17-26.
 28. Sahebkar A, Pirro M, Banach M, Mikhailidis DP, Atkin SL and AFG Cicero. (2018). Lipid-lowering activity of artichoke extracts: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58: 2549-2556.
 29. Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R and R Meier. (2007). An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Complement. Med. Res.* 14: 70-80.

30. Settar P, Yalcin S, Turkmüt L, Ozkan S and A Cahanar. (1999). Season by genotype interaction related to broiler growth rate and heat tolerance. *Poult. Sci.* 78: 1353-1358.
31. Shini A, Shini S and WL Bryden. (2018). Fatty liver haemorrhagic syndrome occurrence in laying hens: impact of production system. *Avian Pathol.* 48: 25-34.
32. Soltanian A, Mosallanejad B, Razi Jalali M, Najafzadeh VH and M Ghorbanpour. (2020). Comparative evaluation of therapeutic effects of silymarin and hydrocortisone on clinical and hematological alterations, and organ injury (liver and heart) in a low-dose canine lipopolysaccharide-induced sepsis model. *Vet. Res.* 11: 235-241.
33. Trott KA, Giannitti F, Rimoldi G, Hill A, Woods L, Barr B, Anderson M and A Mete. (2014). Fatty liver hemorrhagic syndrome in the backyard chicken: a retrospective histopathologic case series. *Vet. Pathol.* 51: 787-795.
34. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillan E, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, Garcia-Luna YG-RM, Gayosso-de-Lucio JA and JA Morales-Gonzalez. (2014). Hepatoprotective effect of silymarin. *World J. Hepatol.* 6: 144-149.
35. Wang JH, Liu YL, Li CL, Yu J, Li XH, Wang FX and Y Li. (2012). Effect of chlorogenic acid extracted from *Eucommia ulmoides* oliv on hyperlipemia of mice induced by high-fat diet. *Sci. Technol. Food Ind.* 15: 360-375.
36. Wang Q, Liu T, Koci M, Wang Y, Fu Y, Ma M, Ma Q and L Zhao. (2023). Chlorogenic acid alleviated aflb1-induced hepatotoxicity by regulating mitochondrial function, activating Nrf2/HO-1, and inhibiting noncanonical NF- κ B signalling pathway. *Antioxidants* 12: 2027.
37. Yousefi M, Shivazad M and I Sohrabi-Hagddoost. (2025). Effect of dietary factors on induction of fatty liver-hemorrhagic syndrome and its diagnosis methods with use of serum and liver parameters in laying hens. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 568-572.
38. Zhao H, Li Z, Sun Y, Yan M, Wang Y, Li Y, Zhang Y and M Zhu. (2024). Supplementation of chlorogenic acid alleviates the effects of H₂O₂- induced oxidative stress on laying performance, egg quality, antioxidant capacity, hepatic inflammation, mitochondrial dysfunction, and lipid accumulation in laying hens. *Antioxidants* 13: 1303.

EVIDENZA DI BATTERIEMIA PRECOCE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* IN POLLI DA CARNE

Garbuio M.¹, Baglioni A.¹, Bacchin C.¹, Guolo A.¹, Vedana M.¹, Zandonà L.¹, Cordioli B.¹, Gobbo E.¹, Meuter A.², Borchardt G.², Drigo I.¹, Bano L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT2 sezione di Treviso, Vicolo Giuseppe Mazzini 4, 31020, Fontane di Villorba (TV), Italia;*

²*Christian Hansen A/S, Boege Alle 10-12, 2970 Hoersholm, Danimarca.*

Summary

Enterococcal spondilitis is an emerging disease in commercial broiler flocks caused by *Enterococcus cecorum* (EC) and it can result in significant economic losses for broiler farms.

It has been demonstrated that the intestinal load of EC in the first week of life is strongly related with the probability to develop the disease during the production cycle, with septicemic strains being genetically distinct from commensal gut isolates.

The aim of this study was to follow the dynamic of EC intestinal load and extra-intestinal localization in experimentally infected commercial broilers.

A pathogenic EC strain, selected through chicken embryo lethality testing from bones isolates, was administered via oral gavage to 110 one-day-old chicks ROSS 308 while a group of the same size was kept as negative control. At day 1 the intestinal content of the chicks resulted negative for EC by a real-time PCR method. On days 5, 11, 18, 24, 32, 38, and 47, bacteriological analyses of femur and spleen were performed using selective media THBY (Todd Hewitt Broth with 1% yeast extract) and CNA (Columbia agar enriched with colistin, nalidixic acid and 5% sheep red blood cells), while intestinal contents were collected for quantitative EC detection by a specific real-time PCR. Blood samples were examined bacteriologically on day 5, and from day 32 onwards, the free thoracic vertebrae were also included in the analysis. Pulsed Field Gel Electrophoresis was employed to confirm the genetic identity of isolates from different organs.

The control group became naturally infected through cross-contamination and EC reached the same gut colonisation levels in the two groups but at different times. EC was isolated from the organs of 31 birds (14 controls, 17 infected), with 7 birds showing multi-organ infection. By day 5, EC was detected in the blood and organs of some birds in both groups.

These findings illustrate EC's ability to rapidly disseminate to and persist within crucial skeletal sites early in life, highlighting the critical role of early gut colonization. Consequently, preventive actions are essential from the first day of the productive cycle, mainly when the chicks are housed in farms with recurrent EC infections outbreaks.

INTRODUZIONE

In patologia aviaria gli enterococchi sono responsabili di onfaliti, endocarditi ed encefaliti e di alcune infezioni del sistema scheletrico. Negli ultimi 15 anni, ceppi patogeni di *Enterococcus cecorum* (EC) sono emersi come agenti responsabili

di setticemia e di infezione scheletrica nei polli da carne, con un elevato impatto economico a livello mondiale. Comparsa in Italia nel 2009, la spondilite enterococcica è una patologia emergente nell'allevamento industriale del broiler e ha diffusione cosmopolita (Bano et al., 2010). Colpisce preferibilmente polli da carne maschi a partire da 28 giorni di vita e riproduttori di 6-8 settimane, con morbilità e mortalità che possono raggiungere rispettivamente il 35% e il 15% (Jung et al., 2018).

La spondilite enterococcica è il principale reperto patologico dovuto alla localizzazione di EC a livello della sesta vertebra toracica (T6), unica vertebra toracica libera. In soggetti a rapido accrescimento come gli ibridi commerciali moderni, lo scheletro subisce sollecitazioni meccaniche che si concentrano su questa vertebra, comportando microfratture ossee simili a quelle che si osservano nelle ossa lunghe in caso di osteocondrosi disseccante (ODC), che può essere seguita da osteonecrosi batterica con osteomielite (BCO) (Wideman, 2016). Infatti, in casi di setticemie da EC, le microemorragie intraossee favoriscono la disseminazione in tale tessuto dei batteri circolanti e un loro successivo sequestro all'interno di tessuto osseo immaturo. Qui i batteri cominciano la loro azione litica nei confronti del tessuto osseo e la conseguente spondilite, con richiamo di cellule infiammatorie. Con il tempo, nel corpo vertebrale, viene a crearsi un nucleo di materiale osteo-necrotico-eterofilo che può fistolizzare sia verso la cavità celomatica, dove viene racchiuso in una capsula fibrosa che circonda classicamente la lesione, sia verso il canale vertebrale dove può causare compressioni del midollo spinale in seguito al cedimento del tessuto vertebrale patologico. A volte viene interessata anche T7, dove si può osservare la stessa lesione nodulare presente in T6 e che gli anglosassoni definiscono comunemente come "accessi vertebrali" (Wideman, 2016). Questa localizzazione assume un quadro clinico caratteristico definito "*kinky back*", in cui il soggetto tende ad appoggiarsi sui tarsi o sul cocchige con entrambi gli arti inferiori estesi cranialmente, difficoltà o impossibilità al mantenimento della stazione e alla locomozione e, conseguentemente, ridotta assunzione di alimento ed acqua.

Le lesioni e la sintomatologia (*kinky back*) che si osservano in caso di spondilite sono solo le manifestazioni più evidenti di setticemie precoci da EC. Infatti, non è infrequente l'isolamento del microrganismo da organi parenchimatosi o da segmenti ossei di pulcini di pochi giorni. Altre sedi sottoposte a stress di questo tipo nel broiler in accrescimento sono le teste femorali, dove infatti si può avere un annidamento del battere secondo lo stesso processo.

È stato dimostrato che questi ceppi di EC hanno origine dall'intestino ed il loro passaggio nel sangue dipende dall'alto tasso di colonizzazione intestinale presente nella prima settimana di vita (Borst et al. 2017, Jung et al., 2017). Tuttavia, i ceppi di EC isolati da lesioni presentano caratteristiche biochimiche, genetiche e di virulenza diverse da quelli intestinali ritrovati in soggetti sani o isolati in altre specie. Inoltre, studi di metagenomica sulle comunità microbiche intestinali del pollo da carne, hanno ampiamente dimostrato come EC, e gli enterococchi in generale, siano normali componenti del microbiota intestinale di soggetti "adulti" (> 21 gg), mentre dovrebbero essere pressoché assenti in pulcini di pochi giorni, evidenziando come l'elevata carica intestinale di EC a quest'età sia un reperto effettivamente anomalo (Shaafi et al., 2015).

Per prevenire l'anomala colonizzazione intestinale precoce da EC è possibile ricorrere alla somministrazione di probiotici che consentirebbero di consolidare la barriera intestinale stimolando la produzione di proteine di giunzione (tight junctions); stimolare il sistema immunitario e cercare di selezionare la flora microbica escludendo competitivamente i patogeni (Ulluwishewa et al., 2011).

Per prevenire la comparsa di spondilite è utile evitare di accasare i pulcini su lettieri troppo morbide o con superficie irregolare che favoriscono l'incidenza di OCD del femore e delle vertebre, e può essere utile somministrare vitamina D3 (25-OHD3) in acqua (33.9 µg/L) per favorire la mineralizzazione dell'osso (Wideman et al., 2015). L'impiego di antimicrobici nei primi giorni di vita è fortemente sconsigliato essendo tali ceppi multiresistenti.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare la dinamica di diffusione di un ceppo patogeno di EC, somministrato per via orale, in vari distretti anatomici di polli da carne commerciali.

MATERIALI E METODI

Selezione del ceppo – Embryo lethality test

La selezione del ceppo è avvenuta attraverso l'esecuzione dell'*embryo lethality test* descritto da Huang et al. (2023) ed è stata applicata a ceppi isolati da distretti ossei durante l'attività necroscopica svolta presso la sezione diagnostica di Treviso dell'IZS delle Venezie. Brevemente, 15 ceppi (5 da femore e 10 da vertebra) di *E. cecorum* sono stati inoculati a un titolo di 5×10^4 UFC/mL in 5 repliche ciascuno, nella cavità allantoidea di embrioni di pollo di 10 gg. Le uova sono state incubate a 37,5 °C con 45% di umidità relativa in condizioni di microaerofilia e ispezionate tramite speratura ogni 24 ore per 7 gg. L'inoculo di 200 µL è stato ottenuto facendo crescere i vari ceppi in brodo colturale *brain heart infusion* (BHI) per 24 h a 37±2 °C, poi risospesi in PBS sterile e conservati a 4 °C per 18-24 h. In 5 uova sono stati inoculati 200 µL/uovo di soluzione PBS sterile come controllo negativo.

Animali sperimentali

La sperimentazione ha ottenuto parere favorevole da parte del comitato etico dell'IZS delle Venezie ed è stata autorizzata dal Ministero della salute (autorizzazione n. 1147/2024-PR).

Duecentotrenta pulcini Ross 308 sono stati accasati all'età di 1 giorno e suddivisi in 2 gruppi da 110 soggetti ciascuno. Prima della suddivisione, 10 soggetti sono stati scelti casualmente per una valutazione quantitativa della carica intestinale di *E. cecorum* prima dell'infezione sperimentale. I pulcini erano ospitati all'interno di cerchi di plastica contenuti in box di 4,20 m² con lettiera di truciolo e all'interno 2 mangiatoie e 2 abbeveratoi a campana. Nelle prime 2 settimane la temperatura corretta è stata assicurata da lampade riscaldanti. All'età di 10 gg i cerchi sono stati rimossi e i soggetti sono rimasti all'interno dei box stessi simulando, per quanto possibile, le condizioni d'allevamento.

Preparazione dell'inoculo batterico e somministrazione

L'inoculo è stato allestito in PBS utilizzando il ceppo selezionato tramite *embryo lethality test*. Uno dei 2 gruppi di pulcini è stato infettato sperimentalmente all'età

di 1 giorno somministrando tramite gavage 0,5 mL della sospensione batterica alla concentrazione di 2×10^8 UFC/mL. All'altro gruppo sono stati somministrati 0,5 mL di PBS sterile. Il titolo dell'inoculo e la purezza sono stati verificati subito dopo la somministrazione attraverso semina su piastra di agar sangue.

Accertamenti di laboratorio

Gli animali sono stati monitorati quotidianamente per rilevare la presenza di segni clinici riconducibili all'infezione sostenuta da EC. Nei giorni 5, 11, 18, 25, 32 e 39, 15 soggetti per gruppo sono stati sacrificati per l'esecuzione di esami anatomopatologici nel corso dei quali sono stati eseguiti esami batteriologici da femore, milza e vertebra (questa matrice dal giorno 32). L'esame batteriologico è stato condotto inoculando 3 mL di THBY, incubati a 37 °C in microaerofilia. Dopo 24 ore è stata prelevata un'aliquota dei singoli brodi colturali inoculati con campioni prelevati da uno stesso soggetto, aggregate in pool da 3 e sottoposte a real-time PCR specifica per EC (Jung et al., 2017). I brodi che costituivano i pool risultati positivi, sono stati piastrati singolarmente su terreno selettivo (Columbia agar arricchito con colistina e acido nalidixico con 5% di sangue ovino - CNA) e incubati per 24-48 ore in microaerofilia a 37 °C. Le colonie riferibili morfologicamente a EC sono state identificate mediante analisi MALDI TOF MS utilizzando lo strumento Sirius Biotyper® (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). In aggiunta ai campioni sopramenzionati il giorno 5 è stato sottoposto allo stesso procedimento (PCR e colturale dai positivi) anche il sangue. Dall'intestino degli stessi soggetti sacrificati a 1, 5, 11, 18, 25, 32, 39, 47 giorni è stata eseguita la quantificazione di EC tramite real-time PCR. Alcuni dei ceppi isolati nel corso della sperimentazione e il ceppo utilizzato per l'infezione sono stati sottoposti a Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) per confermare il profilo identitario del ceppo isolato secondo il protocollo disponibile nel sito del Center for Disease and Control Prevention (www.cdc.gov). Gli animali rimanenti a fine sperimentazione (giorno 47) sono stati sottoposti ad eutanasia e ai prelievi previsti negli altri giorni di campionamento.

RISULTATI

Selezione del ceppo – Embryo lethality test

In tabella 1 sono riportati i risultati dell'*embryo lethality test*. È stato ritenuto maggiormente patogeno il ceppo che ha provocato la mortalità maggiore e nel minor tempo degli embrioni contenuti nelle 5 uova inoculate. Sulla base di questi criteri, il ceppo 11 è stato scelto per l'infezione sperimentale dei pulcini, in quanto ha causato il 100% di mortalità (5 embrioni su 5) in 2 giorni.

Tabella 1. Risultati dell'*embryo lethality test* condotto con 15 ceppi isolati da casi clinici di spondilite in polli da carne allevati e conferiti presso il laboratorio diagnostico di IZSve (sede di Treviso).

	SITO DI ISOLAMENTO	MORTALITÀ (%)							% mortalità totale
		Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 5	Giorno 6	Giorno 7	
1	femore	3 (60%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80
2	vertebra	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
3	vertebra	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80
4	femore	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
5	femore	0 (0%)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
6	vertebra	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	40
7	femore	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	3 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
8	femore	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
9	vertebra	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
10	vertebra	1 (20%)	2 (40%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80
11	vertebra	4 (80%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	100
12	vertebra	1 (20%)	2 (40%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80
13	vertebra	1 (20%)	0 (0%)	2 (40%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80
14	vertebra	1 (20%)	3 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80
15	vertebra	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	80

Esami batteriologici e PFGE

Nel corso dell'intero periodo sperimentale, EC è stato isolato da 40 campioni: 16 dal gruppo di controllo e 24 dal gruppo infetto, di cui un ceppo da un soggetto soppresso il giorno 36 per kinky back (Tabella 2). Almeno 1 ceppo è stato isolato da tutti i tessuti indagati (femore, milza, sangue e vertebra toracica) a diverse età. In tabella 2 si può osservare che in 7 individui si è riscontrata la positività in più organi contemporaneamente.

L'analisi batteriologica ha rivelato una dinamica di infezione extra-intestinale temporalmente distinta tra i due gruppi (Grafici 1 e 2).

La PFGE è stata eseguita su 17/39 isolati. La metodica ha confermato la corrispondenza genomica di tutti i ceppi indagati (stesso pulsotipo).

Grafico 1. Esito degli esami batteriologici condotti nel gruppo infettato sperimentalmente.

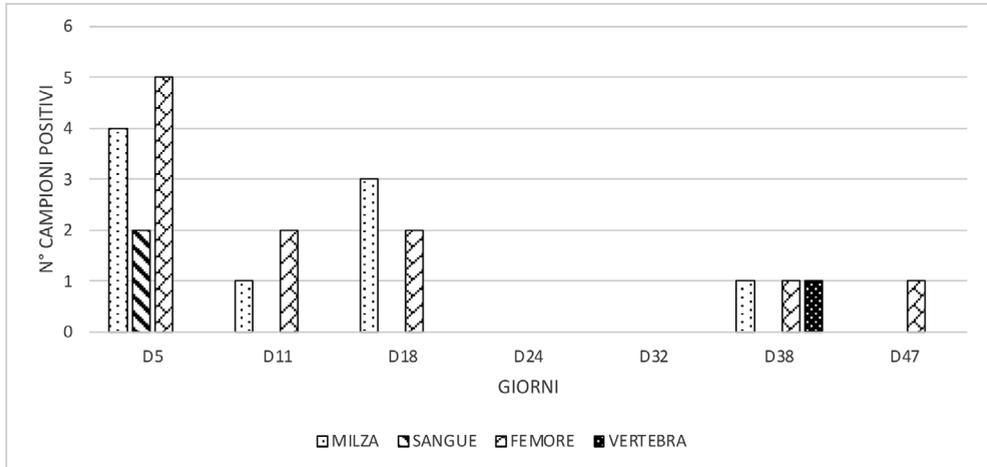
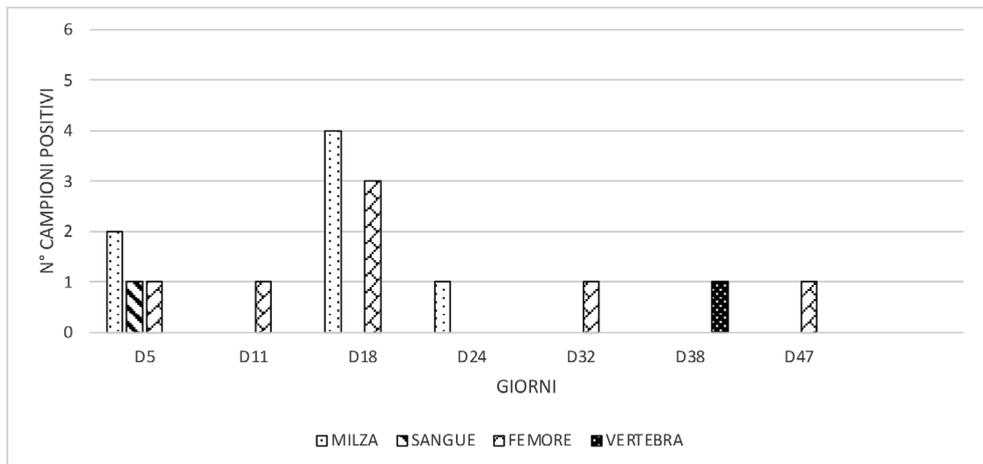


Grafico 2. Esito degli esami batteriologici condotti nel gruppo controllo negativo.

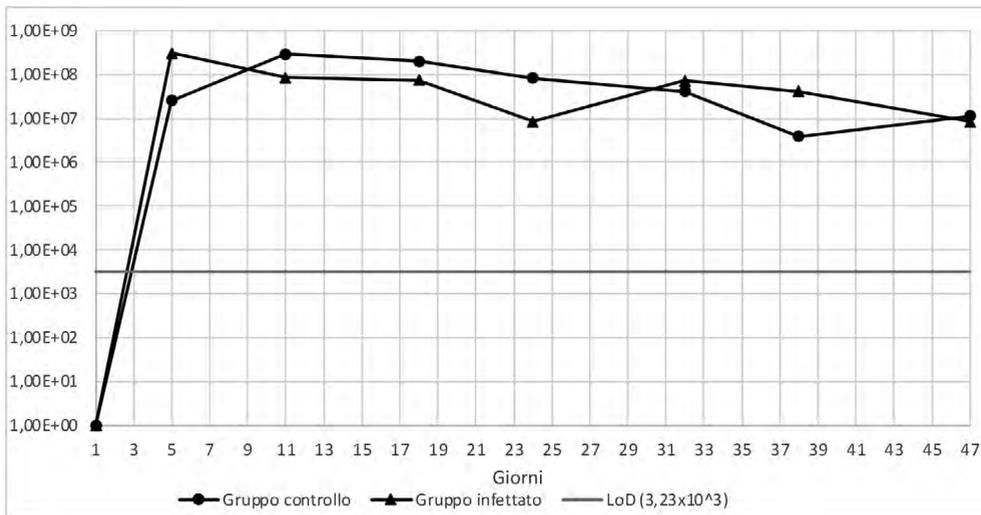


Contenuto intestinale

Nel Grafico 3 sono riportati i risultati della quantificazione intestinale della carica di EC effettuata tramite real-time PCR. In entrambi i gruppi, il giorno di accasamento non è stata rilevata alcuna presenza di EC nel contenuto intestinale ($LoD: 3,23 \times 10^3$). Il valore medio più elevato di carica intestinale si è raggiunto per il gruppo infetto il giorno 5, con valore medio di $3,13 \times 10^8$ UFC/g. Nel gruppo controllo invece il picco si è registrato il giorno 11, con un valore medio di $2,94 \times 10^8$ UFC/g. La carica intestinale è rimasta sopra i 10^8 UFC/g fino al giorno 18 solo nel gruppo controllo, mentre a partire dal giorno 11 ha iniziato a diminuire nel gruppo infettato, scendendo

a valori medi di 10^7 UFC/g. Questo valore si è mantenuto stabile in questo gruppo, ad eccezione del giorno 24 e 47, quando la carica media si è ridotta a 10^6 UFC/g. Nel gruppo controllo, invece, dal giorno 24 fino alla fine della sperimentazione, i valori medi sono rimasti sopra 10^7 UFC/g anche, sebbene in diminuzione, raggiungendo un minimo di $3,83 \times 10^6$ UFC/g solo il giorno 38.

Grafico 3. Andamento della carica intestinale registrato durante la sperimentazione.



DISCUSSIONE

L'andamento della carica intestinale di EC rispecchia la differente dinamica dell'infezione e le modalità. Infatti il gruppo infettato il primo giorno di vita, ha presentato la carica intestinale massima il giorno 5 mentre il gruppo controllo ha raggiunto il picco il giorno 11. Successivamente, la carica intestinale ha seguito lo stesso andamento nei 2 gruppi conservando il gap temporale iniziale, per raggiungere la stessa carica intestinale a fine sperimentazione.

L'isolamento di EC da entrambi i gruppi (infettato e controllo negativo) indica che è avvenuto un passaggio del ceppo sperimentale al gruppo controllo, secondo delle modalità che mimano, seppure in modo più restrittivo, quanto avviene in campo. Infatti, questo si è verificato nonostante la separazione tra gruppi (cerchi diversi all'interno di box diversi separati da un corridoio all'interno della stesso capannone), le attenzioni poste dal personale dello stabulario e la ovvia mancanza di promiscuità dei materiali impiegati (mangiatoie, abbeveratoi, lettiera). Queste attenzioni non sono normalmente necessarie all'interno dello stesso gruppo in condizioni di allevamento, in cui il patogeno dovrebbe quindi diffondere ancora più facilmente. Questa eventualità ci ha permesso comunque di confrontare la dinamica di infezione da EC in due condizioni: infezione tramite gavage e infezione simile a quella "naturale". L'aspetto più rilevante è che per entrambe le modalità d'infezione, il patogeno era presente nel 33% dei soggetti di entrambi i gruppi già a 5 giorni di vita, con assenza di carica in intestino il giorno di accasamento. Questo dato andrebbe comparato in

uno studio d'infezione sperimentale simile, condotto impiegando un ceppo "non patogeno" definito sulla base dell'*embryo lethality test*.

La diminuzione, nel tempo, degli isolamenti di EC e della carica intestinale media dimostrano come, anche in assenza di trattamenti antimicrobici, individui sani siano in grado di rispondere all'infezione e debellare il patogeno nei distretti extra-intestinali. Non sappiamo se l'esito sarebbe stato lo stesso in caso di patologie concomitanti, soprattutto di natura immunodepressiva.

CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che ceppi patogeni di EC colonizzano l'intestino in pochi giorni e il 5° giorno (forse anche prima) raggiungono distretti ossei. Di conseguenza, eventuali azioni preventive volte a diminuire la probabilità di sviluppo della malattia (spondilite inclusa) o la diffusione dell'infezione ad altri gruppi, devono necessariamente venir applicate dal primo giorno di vita. Garanzie di assenza di circolazione di ceppi patogeni in incubatoio sarebbe già una buona profilassi diretta.

BIBLIOGRAFIA

1. Bano L, Bonci M, Drigo I, Ferro T, Vascellari M, Cesca A and F Agnoletti. (2010). Spondilite da *Enterococcus cecorum* nel pollo da carne. *49° Convegno Della Società Italiana Di Patologia Aviaria (SIPA)*, Forlì, pp. 81-85.
2. Borst LB, Suyemoto MM, Sarsour AH, Harris MC, Martin MP, Strickland JD, Oviedo EO and HJ Barnes. (2017). Pathogenesis of Enterococcal Spondylitis Caused by *Enterococcus cecorum* in Broiler Chickens. *Vet Pathol.* 54(1): 61-73.
3. Jung A, Chen LR, Suyemoto MM, Barnes HJ and LB Borst. (2018). A review of *Enterococcus cecorum* infection in poultry. *Avian Dis.* 62(3): 261-271.
4. Jung A, Petersen H, Teske L and S. Rautenschlein. (2017). Colonization patterns of *Enterococcus cecorum* in two different broiler production cycles detected with a newly developed quantitative real-time PCR. *BMC Microbiol.* 17: 1-8.
5. Shaufi MAM, Sieo CC, Chong CW, Gan HM and YW Ho. (2015). Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut Pathog.* 7(1): 1-12.
6. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, Moughan PJ, Wells JM and NC Roy. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* 141(5): 769-776.
7. Wideman Jr RF, Blankenship J, Pevzner IY and BJ Turner. (2015). Efficacy of 25-OH vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring. *Poult. Sci.* 94(8): 1821-1827.
8. Wideman Jr RF. (2016). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. *Poult. Sci.* 95(2): 325-344.

ASPERGILLOSI IN *SPHENISCUS DEMERSUS*: ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI IN PINGUINI DEL GIARDINO ZOOLOGICO DI PISTOIA

Giordano V.¹, Samarelli R.¹, Petrella A.², Pugliese N.¹, Romito D.¹, Cordon R.³, Cavicchio P.³, Salierno D.¹, Prioletti M.¹, D'Onghia F.¹, Circella E.¹, Camarda A.¹

¹*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S.P. Casamassima Km3, 70010 Valenzano (BA), Italia;*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Via Manfredonia 20, 71121 Foggia, Italia;*

³*Giardino Zoologico di Pistoia, Via a Pieve Celle Nuova 160/A, 51100 Pistoia, Italia.*

Summary

Between 2020 and 2024, the Avian Pathology Unit of the University of Bari 'Aldo Moro' collaborated with the Pistoia Zoological Garden to monitor the circulation of *Plasmodium* spp., the etiological agent of avian malaria, in the colony of African penguins (*Spheniscus demersus*) hosted in the zoo, as part of an avian malaria surveillance and control strategy. During necropsies performed on three deceased individuals, pathological lesions consistent with infection by *Aspergillus fumigatus* — the fungal agent responsible for aspergillosis — were also identified. These incidental findings prompted further investigation into the presence of *Aspergillus* spp., as it is a stealthy opportunistic pathogen frequently encountered in zoos and wildlife rehabilitation centers, yet remains extremely challenging to diagnose and control.

Necropsy revealed granulomatous lesions affecting the air sacs, lungs, and various abdominal organs. Histopathological examination confirmed systemic aspergillosis, which was further supported by fungal culture and molecular identification. *A. fumigatus* was isolated from all three birds, while the female also tested positive for *Plasmodium relictum* (lineage SGS1). These findings highlight the subclinical and rapidly progressive nature of aspergillosis in captive penguins, enhanced by stress or immunosuppressive conditions. Prevention, through environmental monitoring, early diagnosis, and targeted health management, is the most effective strategy to mitigate the impact of this disease in ex-situ conservation programs.

INTRODUZIONE

Il pinguino africano (*Spheniscus demersus*) è attualmente classificato come specie in pericolo, secondo la Lista Rossa dell'IUCN, a causa di un drastico calo della popolazione registrato negli ultimi decenni (*The IUCN Red List of Threatened Species: Spheniscus demersus*, 2020). In Sud Africa, il numero di coppie riproduttive è sceso da circa 70.000 nel 1978 a meno di 20.000 nel 2015, mentre in Namibia si è passati da oltre 12.000 a circa 5.800 coppie. Questo declino, superiore al 50% in tre generazioni, è attribuito principalmente alle attività antropiche, come la pesca industriale, che riduce la disponibilità di risorse alimentari, e l'inquinamento da idrocarburi, che ha effetti negativi sulla riproduzione e sulla

sopravvivenza dei giovani (Crawford et al., 2011; Pichegru et al., 2015; Sherley et al., 2020).

Per contrastare questa crisi, sono state avviate numerose azioni di conservazione in-situ, tra cui la creazione di aree protette, l'installazione di nidi artificiali, la riabilitazione degli individui contaminati da petrolio e la regolazione della pesca attorno alle colonie. Tuttavia, poiché non sono risultate sufficienti, diventa sempre più rilevante affiancare strategie di conservazione ex-situ, come la riproduzione in cattività e i programmi di traslocazione, con l'obiettivo di mantenere nuclei vitali della specie e supportarne eventuali reintroduzioni (Conde et al., 2011).

In questo contesto, Il giardino zoologico di Pistoia aderisce all'EAZA (European Association of Zoos and Aquariums) e contribuisce al progetto EEP (EAZA Ex-situ Programmes), che prevede la riproduzione di animali appartenenti a specie a rischio di estinzione nell'ottica del "One Plan Approach". Lo stesso istituto si occupa indirettamente di conservazione *in-situ* attraverso il finanziamento del SANCCOB (Southern African Foundation for the Conservation of Coastal Birds) e la promozione dell'adozione di pinguini a distanza.

Il parco ospita una colonia di pinguini africani, tenuti in un exhibit all'aperto, dotato di un'area asciutta e di una piscina. In seguito a episodi di mortalità occasionale, gli animali sono stati esaminati tramite esame autoptico e metodiche molecolari, nei laboratori della sezione di Patologia Aviare di Bari, all'interno di uno studio pilota sulla malaria nello *S. demersus*. Il ritrovamento di lesioni coerenti con *Aspergillus* spp. ha invece reindirizzato alcune delle attività diagnostiche e ricerca proprio verso questo micete, che risulta complesso da diagnosticare ante-mortem.

Aspergillus fumigatus in particolare, più raramente altre specie quali *A. flavus* o *A. niger*, è il principale responsabile di aspergillosi nei volatili (Cabañes, 2020), una malattia fungina che comprende un'ampia gamma di infezioni, con esiti clinici variabili in base allo stato immunitario dell'ospite e alle condizioni ambientali (Hinson et al., 1952).

Tra i principali fattori di patogenicità di *A. fumigatus* vi è la produzione di micotossine, in particolare la gliotossina, nota per le sue proprietà citotossiche e immunosoppressive (Lewis et al., 2005). Altri metaboliti, come l'aflatossina, la T2-tossina e la verruculogina, contribuiscono ulteriormente alla patogenesi attraverso effetti immunomodulatori e danni diretti ai tessuti respiratori (Tomee & Kauffman, 2000; Khoufache et al., 2007).

A. fumigatus possiede, inoltre, una straordinaria capacità di adattamento ambientale, che ne facilita la diffusione e la colonizzazione. La sua termotolleranza (12-65°C), la resistenza a pH estremi (2.1 – 8.8) (Kwon-Chung & Sugui, 2013), la presenza di melanina nella parete cellulare e la dimensione ridotta dei conidi (2–3 µm) ne consentono il trasporto profondo nelle vie respiratorie, dove può aderire e invadere l'epitelio (Bhabhra & Askew, 2005). Tali caratteristiche, evolutesi in contesti ambientali ostili come il compost o i materiali in decomposizione, si rivelano vantaggiose anche all'interno dell'organismo animale (Gravelat et al., 2013).

Nel contesto degli zoo (Guillot, 2018), dove coesistono numerose specie non autoctone e con esigenze fisiologiche molto differenti, i fattori predisponenti

all'aspergillosi risultano amplificati. Condizioni come la cattività prolungata, la convivenza forzata, il trasporto, le variazioni climatiche, l'esposizione a micotossine ambientali, nonché lo stress cronico e la conseguente immunosoppressione, rappresentano elementi di rischio significativi. Inoltre, la diagnosi di aspergillosi risulta particolarmente complessa a causa dell'eterogeneità clinica tra le diverse specie e della limitata disponibilità di protocolli diagnostici validati per animali non convenzionali (Desoubeaux et al., 2022). I pinguini sono animali che risultano particolarmente vulnerabili quando ospitati in strutture soggette a un elevato afflusso di visitatori, spostamenti frequenti, habitat umidi, scarsa ventilazione o concentrazioni elevate di ammonio derivante da materiali organici (Debergh et al., 2023; Desoubeaux et al., 2022). La loro suscettibilità all'infezione è legata soprattutto alla particolare anatomia e fisiologia dell'apparato respiratorio: le spore di *Aspergillus spp.*, grazie alle ridotte dimensioni, riescono a eludere gli scarni meccanismi di clearance mucociliare delle alte vie respiratorie (John, 2005) e, non trovando ostacoli quali epiglottide o diaframma, raggiungono i sacchi aerei posteriori, dove germinano grazie alle condizioni ottimali di temperatura e ossigeno (Tell, 2005; Arné et al., 2021). A queste caratteristiche intrinseche si devono sommare le condizioni ambientali sfavorevoli, come il sovraffollamento, lo stress cronico e l'inadeguatezza microclimatica degli ambienti di cattività, che favoriscono l'immunosoppressione e aumentano il rischio di infezione (Cateau et al., 2022). Infatti, tra le specie tenute in cattività, gli sfenisciformi (Pinguini di Magellano e Pinguini africani) sembrano essere particolarmente suscettibili all'aspergillosi (Alvarez-Perez et al., 2010), probabilmente poiché hanno dei comportamenti di scavo per la nidificazione, esponendosi così potenzialmente a nuvole di spore fungine durante il contatto con il suolo.

La prevalenza relativa dell'aspergillosi può raggiungere il 20–27% in alcune colonie di pinguini gestite in cattività (Silva Filho et al., 2015), con una incidenza fino al 3,4% l'anno (Cateau et al., 2022). Tuttavia, questi valori devono essere valutati in relazione a una serie di variabili, tra cui la presenza di comorbidità e alla disponibilità di strumenti diagnostici (Desoubeaux et al., 2022).

Lo scopo di questo lavoro è quello di descrivere le lesioni osservate all'esame necroscopico dei soggetti esaminati e i conseguenti rilievi istopatologici dei pinguini africani deceduti per Aspergillosi al fine di arricchire il repertorio delle caratteristiche anatomopatologiche che questo patogeno può dare agli animali. L'occasione è stata utile per alcune riflessioni sulla necessità di focalizzare la ricerca alla messa a punto di percorsi diagnostici e di profilassi utili ad arginare la diffusione e l'impatto che questa malattia può avere su una specie sensibile, ma soprattutto a rischio, quale il Pinguino africano mantenuto in cattività nelle strutture zoologiche.

MATERIALI E METODI

Il caso clinico

Gli esami necroscopici sono stati eseguiti tra il 29 settembre e il 21 dicembre 2023 presso la Sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari 'Aldo Moro' su tre pinguini, 2 adulti e 1 subadulto appartenenti alla specie *Spheniscus demersus*. Tutti e tre i pinguini, che facevano parte di una colonia sottoposta a monitoraggio nei confronti della malaria aviare,

non avevano evidenziato particolare sintomatologia ed erano pertanto sfuggiti ad indagini cliniche specifiche da parte dello staff sanitario dello zoo. Due di essi erano stati ritrovati già morti, mentre un terzo esemplare di sesso femminile, che era in cova, era deceduto dopo un brevissimo periodo di malessere durante il quale aveva manifestato solo disoressia ed anoressia.

Esami di Laboratorio

A seguito dell'esame necroscopico, dagli animali deceduti sono stati prelevati dei campioni d'organo (Tabella 1) che sono stati sottoposti ad esami microbiologici, biomolecolari e istopatologici.

In particolare, per l'esame istopatologico, campioni di fegato, milza, sacchi aerei, polmone, cuore sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina (Feldman & Wolfe, 2014) mediante processatore automatico (Reichert-Jung GmbH, Nussloch, Germany).

Per ciascun campione sono state allestite 5 sezioni, tagliate con un microtomo 2030 Biocut (Reichert-Jung, Nussloch, Germany), montate su vetrini Super Frost (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany), e quindi colorate con Ematosilina Eosina, Periodic Acid-Schiff (PAS) e Impregnazione argentea (Bio-Optica, Milan, Italy) (Bancroft et al., 2004).

L'esame micologico è stato effettuato seminando i campioni su Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubando 25 °C per 15 giorni. Le colonie con morfologia compatibile con *Aspergillus* spp., secondo quanto descritto da de Hoog et al. (2011), sono state sottoposte a subcoltura per l'identificazione specifica.

Per l'identificazione biomolecolare, le colonie sospette sono state sottoposte ad analisi molecolare mediante amplificazione e sequenziamento del tratto ITS (Internal Transcribed Spacer) del rDNA nucleare, utilizzando i seguenti primer (Cafarchia et al., 2014) 57 air samples from 19 sheds (Group I):

- ITS1 – 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS4 – 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Alastruey-Izquierdo et al., 2018)

L'identificazione di *Aspergillus fumigatus* è stata quindi confermata amplificando una regione conservata del gene codificante per la beta-tubulina (*βtub*) utilizzando il seguente set di primers (Lee et al., 2023):

- *βtub3* – 5'-TTCACCTTCAGACCGGT-3'
- *βtub2* – 5'-AGTTGTCGGGACGGAATAG-3'

Sui campioni di sangue, fegato e milza raccolti dai tre pinguini è stata effettuata la ricerca di Emoprotozoi secondo la metodica di Hellgren *et al.* (2004) L'identificazione dei campioni positivi è stata effettuata mediante sequenziamento Sanger dell'amplificato e analisi ed assemblaggio delle sequenze utilizzando il software Mega 11 (Tamura et al., 2021). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle disponibili in GenBank e Malavi (Bensch et al., 2009) utilizzando il software BLAST (Johnson et al., 2008).

RISULTATI

All'anamnesi, come già riportato, i soggetti deceduti non presentavano sintomi clinici specifici riconducibili a una patologia in atto. La morte è sopraggiunta in

modo improvviso e senza segni premonitori evidenti, nonostante i controlli quotidiani da parte degli zoo-keeper. Tuttavia, all'esame esterno delle carcasse, gli animali si presentavano in evidente stato di denutrizione, con marcata cachessia (Figura 1).



Figura 1. Pinguino maschio immaturo. Evidente stato cachettico allo scuoiamento con prominenza della carena sternale

All'apertura della cassa toracica, le lesioni caratteristiche erano localizzate a livello dei sacchi aerei, con presenza di noduli granulomatosi bianco-giallastri di diametro variabile (Figura 2).



Figura 2. Sacco aereo toracico. Lesioni multifocali confluenti, di colore giallastro, con diametro di 1-2 mm.

Lesioni micronodulari giallastre si evidenziavano anche a livello dei muscoli sospensori della trachea (Figura 3a). Sui polmoni erano inoltre evidenti focolai rotondeggianti a margini regolari della dimensione di una capocchia di spillo (Figura 3b).

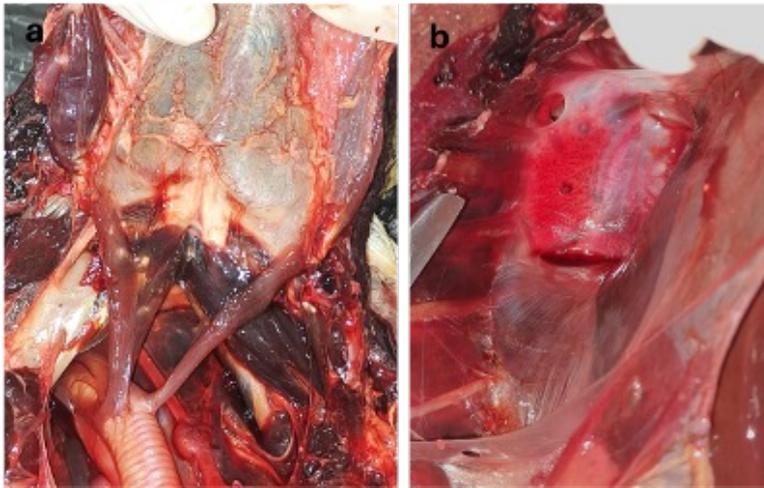


Figura 3. Lesioni micronodulari sui muscoli sospensori della trachea (a). Lesioni nodulari sui polmoni (b). Femmina in cova.

Nei sacchi aerei si osservavano anche raccolte fibrino-caseose giallastre che si insinuavano tra i foglietti, riducendo il flusso dell'aria.

Noduli e lesioni miliari diffuse si osservavano anche a livello degli organi addominali quali reni, fegato, e surreni oltre che dell'apparato gastrointestinale. In particolare, noduli granulomatosi diffusi con una tipica mammellonatura centrale erano osservabili sulla sierosa del tratto cervicale dell'esofago, mentre nel lume si apprezzava essudato di tipo fibrinoso (Figura 4).

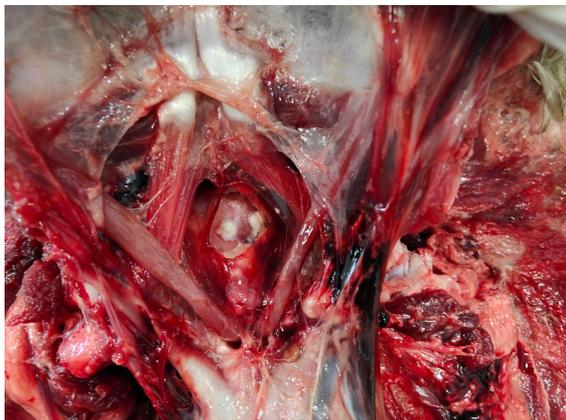


Foto 4. Nodulo fibrino-caseoso nel lume esofageo del pinguino maschio immaturo.

L'esame istopatologico ha consentito di evidenziare, negli organi interessati, quadri compatibili con una massiva presenza di *Aspergillus* spp. Granulomi micotici erano, ad esempio, presenti nei sacchi aerei (Figura 5) e nel polmone, dove vi si associava una diffusa flogosi piogranulomatosa necrotizzante (Figura 6).

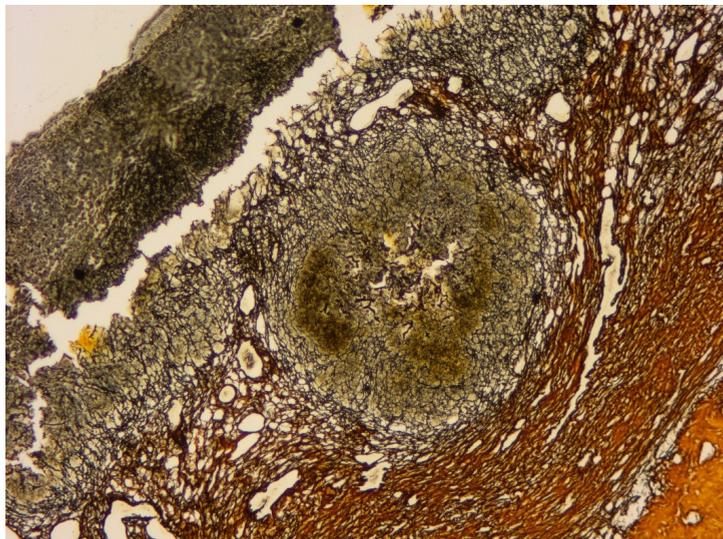


Figura 5. Granuloma micotico nel sacco aereo della Femmina adulta in cova. Impregnazione argentica.

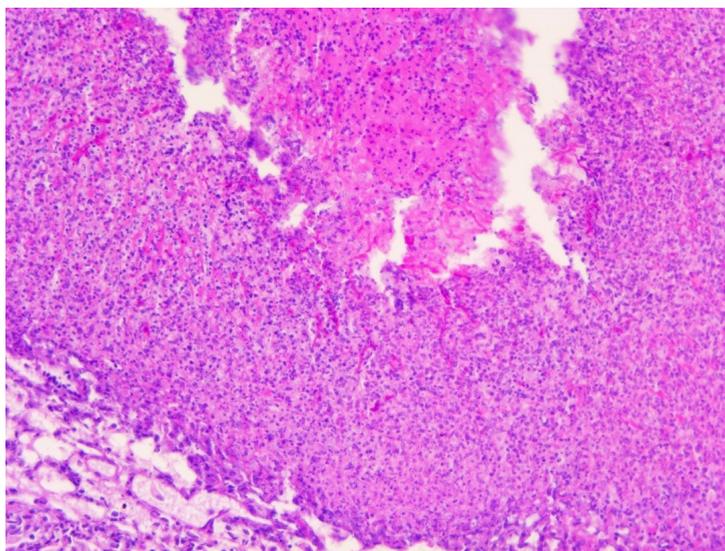


Figura 6. Flogosi piogranulomatosa necrotizzante nel polmone di femmina adulta in cova. Presenza di ife funginee. Colorazione PAS e ingrandimento 20x.

L'analisi microbiologica e biomolecolare dei campioni d'organo prelevati durante le necrosopie (Tabella 1) hanno consentito l'isolamento e l'identificazione di *Aspergillus fumigatus* in tutti i soggetti esaminati.

La femmina in cova è inoltre risultata positiva a *Plasmodium relictum* SGS1.

Tabella 1. Elenco degli organi esaminati e risultati positivi per *Aspergillus fumigatus*.

Organo esaminato	Maschio immaturo	Maschio adulto	Femmina in cova
Polmoni	X	X	X
Reni	X	X	X
Fegato	X	X	X
Milza	X	X	X
Trachea	X	-	X
Sierose	X		X
Cervello	X	X	-
Miocardio	X	-	-
Sacchi aerei	X	X	X

DISCUSSIONE

L'aspergillosi è un'infezione micotica subdola e insidiosa, che può causare morte improvvisa, senza determinare alcun segno clinico evidente. Questo comportamento del micete facilita nel gruppo la diffusione dell'infezione, che spesso tende a divenire endemica. Negli animali esaminati in questo lavoro, non erano stati segnalati sintomi che avrebbero potuto allertare i keepers e consentire interventi volti a ridurre l'impatto della malattia. Questo comportamento clinico silente è ben documentato anche in letteratura (Xavier et al., 2011), ed è dovuto alla capacità di *Aspergillus* spp. di svilupparsi lentamente nei tessuti, provocando lesioni croniche e localizzate prima di un'eventuale disseminazione sistemica, che varia considerevolmente a seconda della specie colpita (Blomme et al., 1998; Abdo et al., 2012; Cabañes, 2020). Questo tipo di decorso complica notevolmente la diagnosi e rende difficile attuare misure terapeutiche efficaci in tempo utile. In diversi casi, la morte sopraggiunge quando il danno d'organo è ormai irreversibile o in presenza di forme disseminate. Lesioni estese a organi extrapolmonari (rene, fegato, ghiandole surrenali, tratto gastrointestinale) come quelle osservate nei pinguini esaminati sono frequenti in cattività, mentre risultano rare in pinguini liberi in natura (Hocken, 2000).

Aspergillus fumigatus spesso agisce come patogeno opportunista, causando co-infezioni o sovrainfezioni in animali immunodepressi o debilitati. In particolare, la presenza di condizioni immunosoppressive, quali stress cronico, terapie farmacologiche (corticosteroidi, antibiotici) o infezioni virali e parassitarie, aumenta significativamente la suscettibilità all'aspergillosi (Chu et al., 2017). Nel caso della femmina adulta sottoposta a necropsopia vi erano certamente almeno 2 condizioni stressanti rilevanti. Infatti, il pinguino era da alcuni giorni in cova

ed era positivo, come confermato dalle indagini di laboratorio, a *Plasmodium relictum*. La malaria ed altre patologie che possono compromettere il sistema immunitario, alterando le difese cellulari, predispongono gli animali a infezioni fungine secondarie (Valkiunas, 2004). In questi casi è difficile discriminare tra patogeno primario e secondario. Le diffuse lesioni osservate che fanno ritenere che la causa della morte fosse in questo esemplare da attribuire ad una aspergillosi cronica.

La presenza di *Aspergillus fumigatus* nei contesti di conservazione ex-situ rappresenta una seria minaccia per la sopravvivenza della specie in cattività, riducendo la longevità, la capacità riproduttiva e il successo dei programmi di reinserimento. Mentre in natura l'aspergillosi è rara e confinata solitamente al tratto respiratorio, negli ambienti antropici essa assume forme più aggressive e disseminate, spesso letali (Hocken, 2000; Xavier et al., 2011). In questo contesto, non si presenta solo come patologia in grado di determinare mortalità negli animali, ma assume anche una criticità rilevante ai fini della conservazione delle biodiversità: le morti improvvise, associate all'impossibilità di effettuare una diagnosi precoce e quindi praticare dei trattamenti tempestivi, evidenziano la necessità di una revisione approfondita dei protocolli di gestione sanitaria in ambiente controllato, con particolare attenzione alla prevenzione ed al monitoraggio delle colonie (Benskin et al., 2009). La prevenzione diventa pertanto l'unico strumento realmente efficace nei pinguini in cattività (Beernaert et al., 2010; Tell, 2005; Toyotome et al., 2022). Uno studio condotto in un giardino zoologico della California del Sud ha evidenziato che nel caso di exhibit chiusi e condizionati, la presenza di sistemi di filtrazione HEPA associati a temperature ambientali più basse costituisce uno dei fattori più efficaci nella riduzione della concentrazione di *Aspergillus* aerodisperso (Martony et al., 2019). Lo studio ha, inoltre, dimostrato che un monitoraggio ambientale fungino condotto durante tutto l'anno può contribuire ad una migliore gestione del rischio, indipendentemente dalla stagionalità. Purtroppo, nelle strutture zoologiche italiane questo approccio non può essere perseguito in quanto i pinguini vengono allevati all'aperto in condizioni ambientali che non possono essere facilmente condizionate. Lo stress subito dagli animali che devono essere sottoposti a manipolazioni frequenti, infine non può non essere considerato tra i fattori di rischio.

Nei soggetti debilitati, in muta, trasportati o ospitati in ambienti stressanti o contaminati, in passato era stata valutata la possibilità di intervenire con somministrazioni, *in profilassi*, di antifungini azolici, in particolare itraconazolo o voriconazolo, entrambi già impiegati con successo nella medicina aviaria (Petraik, 1969). Al di là delle implicazioni negative legate all'utilizzo in metafilassi degli antimicrobici, l'uso preventivo di questi farmaci richiede particolare cautela, in quanto essi possono avere potenziali effetti avversi, tra cui epatotossicità, già documentata in numerose specie aviarie (Beernaert et al., 2010) e, nel pinguino africano, emolisi fatale, che può ricorrere dopo la somministrazione di itraconazolo o voriconazolo (Patson et al., 2024).

Il ricorso a screening periodici, mediante imaging (radiografie, endoscopie) (ITOH et al., 2020) including the King penguin (*Aptenodytes patagonicus*, test molecolari (qPCR su lavaggi respiratori o tamponi) e marcatori ematici (galattomannano, β -D-glucano), sembra promettente e consente di giungere a una dia-

gnosi precoce dell'infezione, anche in assenza di sintomi clinici (Seyedmousavi et al., 2015; Savelieff et al., 2018). L'approccio basato sull'evidenziazione delle lesioni anatomopatologiche in associazione all'isolamento del fungo è, al momento, il gold standard per la diagnosi di Aspergillosi.

Le tecniche molecolari (PCR convenzionale e qPCR) permettono l'identificazione e la quantificazione del DNA fungino nei tessuti (Melloul et al., 2014) (Van Waeyenberghe et al., 2011), mentre la tipizzazione microsatellitare consente di differenziare i ceppi aviari da quelli ambientali e umani (Lair-Fuller et al., 2003; Cateau et al., 2022) e di evidenziare che spesso gli animali sono colonizzati da più tipi contemporaneamente (Alvarez-Perez et al., 2010). I metodi sierologici ELISA per la rilevazione di anticorpi o antigeni (es. galattomannano, β -glucani) hanno mostrato scarsa sensibilità e specificità, e portato a risultati incostanti nei pinguini infetti (Burco et al., 2012; Desoubeaux et al., 2018). Tuttavia, la ricerca è in rapida evoluzione e metodi sempre più innovativi (studio della proteinemia frazionata o il dosaggio della Serum Amyloid A) (Caliendo et al., 2013; Hauck et al., 2020) sono attenzionati dai ricercatori al fine di introdurre strumenti utili ad una diagnosi precoce dell'infezione.

CONCLUSIONI

L'aspergillosi rappresenta una minaccia concreta per la sopravvivenza delle popolazioni di pinguini africani in cattività negli zoo dove solo un approccio multidisciplinare, che unisca monitoraggio ambientale, diagnostica avanzata, gestione sanitaria e benessere animale, potrà contribuire in modo efficace al mantenimento delle colonie e, più in generale, della specie nell'ambito di programmi di conservazione.

DEDICA

In memoria e onore della Professoressa Claudia Cafarchia.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdo W, Kawachi T, Sakai H, Fukushi H, Kano R, Shibahara T, Shirouzu H, Kakizoe Y, Tuji H, and T Yanai. (2012). Disseminated mycosis in a killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(1): 211–218.
2. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, Ayats J, Castro C, García-Rodríguez J, Goterris-Bonet L, Ibáñez-Martínez E, Linares-Sicilia MJ, Martín-Gomez MT, Martín-Mazuelos E, Pelaez T, Peman J, Rezusta A, Rojo S, Tejero R, Anza DV, Viñuelas J, Zapico MS, and M Cuenca-Estrella. (2018). Molecular identification and susceptibility testing of molds isolated in a prospective surveillance of triazole resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(9): e00358-18.
3. Alvarez-Perez S, Mateos A, Dominguez L, Martinez-Nevado E, Blanco JL, and ME Garcia. (2010). Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Veterinary Microbiology* 144(3–4): 444–449.
4. Arné P, Risco-Castillo V, Jouvion G, Le Barzic C, and J Guillot. (2021). Aspergillosis in wild birds. *Journal of Fungi* 7(3): 241.

5. Bancroft JD, Gamble M, Jones ML, and BA Totty. (2004). Theory and practice of histological techniques. Connective tissues and stains, 15th edn. *Churchill Livingstone Publications*, 139–200.
6. Beernaert L, Pasmans F, Van Waeyenberghe L, Haesebrouck F, and A Martel. (2010). *Aspergillus* infections in birds: A review. *Avian Pathology* 39: 325–331.
7. Bensch S, Hellgren O, and J Pérez-Tris. (2009). MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1353–1358.
8. Benskin CMH, Wilson K, Jones K, and IR Hartley. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: A review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 84(3): 349–373.
9. Bhabhra R, and DS Askew. (2005). Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: Role of the fungal nucleolus. *Medical Mycology* 43 Suppl 1: S87–93.
10. Blomme E, Piero F D, Perle KM D L, and PA Wilkins. (1998). Aspergillosis in horses: A review. *Equine Veterinary Education* 10(2): 86–93.
11. Bonaffini G, Rigamonti T, Passarino E, Serpieri M, Prandi I, Ottino C, Quaranta G, Peano A, and M Mauthe Von Degerfeld. (2024). Environmental detection of *Aspergillus fumigatus* spores in a wildlife rescue centre, University of Turin. *ITA*.
12. Burco JD, Ziccardi MH, Clemons KV, and LA Tell. (2012). Evaluation of plasma (1→3) β -D-glucan concentrations in birds naturally and experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. *Avian Diseases* 56(1): 183–191.
13. Cabañes FJ. (2020). Aspergillosis in cats and dogs: Not everything green is *Aspergillus fumigatus*. *Revista Iberoamericana de Micología* 37(3): 79–80.
14. Cafarchia C, Camarda A, Iatta R, Danesi P, Favuzzi V, Di Paola G, Pugliese N, Caroli A, Montagna MT, and D Otranto. (2014). Environmental contamination by *Aspergillus* spp. in laying hen farms and associated health risks for farm workers. *Journal of Medical Microbiology* 63(3): 464–470.
15. Cateau E, Leclerc A, Cartier N, Valsecchi I, Bailly É, Le Senechal R, Becerra M, Le Gallou B, Lavergne R-A, Chesnay A, Robin J-P, Cray C, Goddard N, Thorel M, Guillot J, Mulot B, and G Desoubreaux. (2022). Aspergillosis in a colony of Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) under managed care: A clinical and environmental investigation in a French zoological park. *Medical Mycology* 60(7): myac046.
16. Chu J, Zhang Q, Zuo Z, El-Ashram S, Guo Y, Zhao P, Huang S, He C, and A Khan. (2017). Co-infection of *Chlamydia psittaci* with H9N2, ORT and *Aspergillus fumigatus* contributes to severe pneumonia and high mortality in SPF chickens. *Scientific Reports* 7(1): 13997.
17. Conde D, Flesness N, Colchero F, Jones O, and A Scheuerlein. (2011). An emerging role of zoos to conserve biodiversity. *Science* 331: 1390–1391.
18. Crawford R, Altwegg R, Barham BJ, Barham PJ, Durant JM, Dyer BM, Geldenhuys D, Makhado AB, Pichegru L, Ryan PG, Underhill LG, Upfold L, Visagie J, Waller LJ, and P Whittington. (2011). Collapse of South Af-

- rica's penguins in the early 21st century. *African Journal of Marine Science* 33(1): 139–156.
19. de Hoog S, Guarro J, Gené J, and R Vitale. (2011). *Atlas of Clinical Fungi*.
 20. Debergh H, Becker P, Vercammen F, Lagrou K, Haesendonck R, Saegerman C, and A Packeu. (2023). Pulmonary aspergillosis in Humboldt penguins—Susceptibility patterns and molecular epidemiology of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates from a Belgian zoo, 2017–2022. *Antibiotics* 12(3).
 21. Desoubieux G, Chauvin D, Piqueras MC, Bronson E, Bhattacharya SK, Sirpenski G, Bailly E, and C Cray. (2018). Translational proteomic study to address host protein changes during aspergillosis. *PLOS ONE* 13(7): e0200843.
 22. Desoubieux G, Cray C, and A Chesnay. (2022). Challenges to establish the diagnosis of aspergillosis in non-laboratory animals: Looking for alternatives in veterinary medicine and demonstration of feasibility through two concrete examples in penguins and dolphins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12.
 23. Feldman AT, and D Wolfe. (2014). Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods in Molecular Biology* 1180: 31–43.
 24. Gravelat FN, Beauvais A, Liu H, Lee MJ, Snarr BD, Chen D, Xu W, Kravtsov I, Hoareau CMQ, Vanier G, Urb M, Campoli P, Al Abdallah Q, Lehoux M, Chabot JC, Ouimet MC, Baptista SD, Fritz JH, Nierman WC, and DC Shepard. (2013). *Aspergillus* galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal β -glucan from the immune system. *PLoS Pathogens* 9(8): e1003575.
 25. Guillot J. (2018). *Aspergillus* spp. aerocontamination in a zoological park in France. Results of one-year monitoring in a bird nursery and penguin nests.
 26. Hauck R, Cray C, and M França. (2020). Spotlight on avian pathology: Aspergillosis. *Avian Pathology* 49(2): 115–118.
 27. Hellgren O, Waldenström J, and S Bensch. (2004). A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *The Journal of Parasitology* 90(4): 797–802.
 28. Hinson KFW, Moon AJ, and NS Plummer. (1952). Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. *Thorax* 7(4): 317–333.
 29. Hocken AG. (2000). Cause of death in blue penguins (*Eudyptula m. minor*) in North Otago, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* 27(4): 305–309.
 30. Itoh M, Toyotome T, Matsumoto N, Okamoto M, Watanabe K, and K Yamada. (2020). Characteristic imaging findings of the respiratory system in penguins with suspected aspergillosis in an aquarium. *The Journal of Veterinary Medical Science* 82(9): 1260–1266.
 31. John M. (2005). *The Lung-Air Sac System of Birds: Development, Structure, and Function*.
 32. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, and TL Madden. (2008). NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research* 36(Web Server issue): W5–W9.
 33. Khoufache K, Puel O, Loiseau N, Delaforge M, Rivollet D, Coste A, Cor-

- donnier C, Escudier E, Botterel F, and S Bretagne. (2007). Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology* 7: 5.
34. Kwon-Chung KJ, and JA Sugui. (2013). *Aspergillus fumigatus*—What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS Pathogens* 9(12): e1003743.
 35. Lair-Fulleriger S, Guillot J, Desterke C, Seguin D, Warin S, Bezille A, Chermette R, and S Bretagne. (2003). Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. *Journal of Clinical Microbiology* 41(4): 1798–1800.
 36. Lee R, Kim WB, Cho SY, Nho D, Park C, Yoo IY, Park YJ, and DG Lee. (2023). Clinical implementation of β -tubulin gene-based *Aspergillus* polymerase chain reaction for enhanced *Aspergillus* diagnosis in patients with hematologic diseases: A prospective observational study. *Journal of Fungi* 9(12): Articolo 12.
 37. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, and RA Prince. (2005). Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infection and Immunity* 73(1): 635–637.
 38. Martony M, Nollens H, Tucker M, Henry L, Schmitt T, and J Hernandez. (2019). Prevalence of and environmental factors associated with aerosolised *Aspergillus* spores at a zoological park. *Veterinary Record Open* 6(1): e000281.
 39. Melloul E, Thierry S, Durand B, Cordonnier N, Desoubeaux G, Chandenier J, Bostvironnois C, Botterel F, Chermette R, Guillot J, and P Arné. (2014). Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 37(5–6): 271–279.
 40. Patson CN, Elsmo EJ, Trepanier L, Garner MM, Murray MJ, Bronson E, Clarke LL, Cox SK, Ossiboff RJ, Iredale ME, Miller BM, Waxman L, Litman E, and MI Thurber. (2024). Fatal acute hemolysis following triazole therapy in African penguins (*Spheniscus demersus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 55(2): 479–489.
 41. Petrak ML. (1969). *Diseases of Cage and Aviary Birds*. Lea & Febiger.
 42. Pichegru L, Edwards T, Dilley B, Flower T, and P Ryan. (2015). African Penguin tolerance to humans depends on historical exposure at colony level. *Bird Conservation International* 1.
 43. Savelieff MG, Pappalardo L, and P Azmanis. (2018). The current status of avian aspergillosis diagnoses: Veterinary practice to novel research avenues. *Veterinary Clinical Pathology* 47(3): 342–362.
 44. Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJG, and PE Verweij. (2015). *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: A global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology* 53(8): 765–797.
 45. Sherley R, Crawford R, de Blocq A, Dyer B, Geldenhuys D, Hagen C, Kem-

- per J, Makhado A, Pichegru L, Tom D, Upfold L, Visagie J, Waller L, and H Winker. (2020). The conservation status and population decline of the African penguin deconstructed in space and time. *Ecology and Evolution* 10.
46. Silva Filho RP da, Xavier MO, Martins AM, Ruoppolo V, Mendoza-Sassi RA, Adornes AC, Cabana ÂL, and MCA Meireles. (2015). Incidence density, proportionate mortality, and risk factors of aspergillosis in Magellanic penguins in a rehabilitation center from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 46(4): 667–674.
 47. Tamura K, Stecher G, and S Kumar. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022–3027.
 48. Tell LA. (2005). Aspergillosis in mammals and birds: Impact on veterinary medicine. *Medical Mycology* 43(Supplement 1): S71–S73.
 49. The IUCN Red List of Threatened Species: *Spheniscus demersus*. (2020). *IUCN Red List of Threatened Species*.
 50. Tomee JF, and HF Kauffman. (2000). Putative virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical and Experimental Allergy* 30(4): 476–484.
 51. Toyotome T, Matsumoto N, Itoh M, and K Yamada. (2022). Countermeasures against aspergillosis in captive penguins: Multidisciplinary approach as one aspergillosis control team. 63.
 52. Valkiunas G. (2004). *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press.
 53. Van Waeyenberghe L, Pasmans F, Beernaert L, Haesebrouck F, Vercammen F, Verstappen F, Dorrestein GM, Klaassen CH, and A Martel. (2011). Microsatellite typing of avian clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathology* 40(1).
 54. Xavier M, Pereira Soares M, Cabana Â, Silva-Filho R, Ruoppolo V, Meireles M, and L Severo. (2011). Clinical and pathological findings of aspergillosis in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Ciencia Animal Brasileira* 12: 520–524.

DECIFRARE IL MECCANISMO D'AZIONE DI ANTIBIOTICI E COMPOSTI BOTANICI CON TECNICHE IMMUNOMETABOLICHE AVANZATE

Giovagnoni G.¹, Tugnoli B.¹, Perry F.², Arsenault R.², Grilli E.^{3,4}

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

² *Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, DE 19716;*

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

⁴ *Vetagro Inc., 936 SW 1st Ave, Suite 878 Miami, FL 33130*

Summary

The immunometabolic regulation of macrophages may significantly influence the response of chickens exposed to various challenges. In this study, the immunometabolic role of two antibiotics (oxytetracycline and gentamicin) and a botanical compound (thymol) were investigated on a chicken macrophage-like cell line (HD11) during a *Salmonella* Enteritidis infection. Seahorse metabolic assay was used to characterize the immunometabolic profile of macrophages during the experiment and results were then validated with gene expression and kinome peptide array analysis. Macrophages under exposure to *Salmonella* Enteritidis induced a shift from quiescent to an energetic state. The treatment with oxytetracycline, to which the bacterium was resistant, showed no detectable effects during the challenge, as indicated by the Seahorse assay. Gentamicin, to which the bacterium was sensitive, was shown to keep the cells in a quiescent status even at sub-inhibitory dosages with the Seahorse metabolic assay, with a significant upregulation of IL1B and IL10 gene expression. Thymol was able to shift the metabolism of macrophages to an anaerobic status, associated with the anti-inflammatory phenotype M2. Gene expression analysis revealed a significant increase in IL1B and a numerical upregulation of IL10. Using the kinome array analysis we investigated the main immunometabolic KEGG pathways with changes in phosphorylation. One of the main pathways influenced by the treatments was the C-type lectin receptor signaling pathway. These receptors are expressed on macrophages and are involved in numerous patterns that include pathogen recognition, phagocytosis, and activation of immune signaling. Differences in protein phosphorylation between thymol and gentamicin treatments in this pathway may explain the observed upregulation of IL1B and IL10, and more in general lead to activation of pathways involved in Th17 cell differentiation. Carefully selected antibiotics and botanical compounds can support macrophages during a challenge with *Salmonella* Enteritidis, suggesting that advanced *in vitro* techniques can help unveil different mechanisms of action of compounds prior to their use *in vivo*.

INTRODUZIONE

Salmonella Enteritidis è una delle salmonelle non tifoidee più frequentemente associate a gastroenterite nell'uomo. La trasmissione avviene con il consumo di carni avicole contaminate. Al contrario dell'uomo, la maggior parte dei polli

infetti non mostra sintomi, rendendo difficile prevenire la contaminazione durante la macellazione (Grilli et al., 2011). La diffusione sistemica avviene attraverso la traslocazione intestinale e l'utilizzo dei macrofagi da parte del batterio per eludere il sistema immunitario. Le cellule HD11, una linea cellulare derivata da macrofagi di pollo, sono un modello *in vitro* usato per studiare l'interazione tra macrofagi e *Salmonella* Enteritidis: il batterio può sopravvivere fino ad 8 ore in queste cellule, che a loro volta rispondono aumentando il metabolismo glicolitico per produrre ossido nitrico e citochine (Peng et al., 2018).

L'utilizzo responsabile di antibiotici in zootecnia è diventato di fondamentale importanza per impedire l'instaurarsi di fenomeni di resistenza e, contestualmente, la ricerca di alternative ai farmaci è sempre più richiesta. Il timolo è un monoterpene presente principalmente nell'olio essenziale di timo ed origano e caratterizzato da proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie ed antiossidanti (Rossi et al., 2020). Comprendere il meccanismo d'azione di antibiotici e composti botanici potrebbe favorirne un corretto utilizzo in campo e, a tal fine, l'utilizzo di tecniche avanzate può rappresentare un valido supporto. Lo scopo di questo studio è stato quindi di investigare gli effetti immunometabolici di due antibiotici (ossitetraciclina e gentamicina) ed un composto botanico (timolo) durante un'infezione da *Salmonella* Enteritidis in cellule HD11.

MATERIALI E METODI

Concentrazioni minime inibitorie delle sostanze testate

Le concentrazioni minime inibitorie (MIC) di ossitetraciclina (OSS), gentamicina (GEN) e timolo (TIM) sono state determinate con metodo di microdiluzione in terreno TSB a pH 6.5. Dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C a contatto con una concentrazione batterica iniziale di 10⁵ UFC/mL, le MIC sono state definite come la più bassa concentrazione associate ad una crescita batterica nulla. In base a questi valori sono state selezionate le concentrazioni sub-inibitorie utilizzate durante il challenge HD11.

Infezione di cellule HD11 con Salmonella Enteritidis

Il giorno dell'esperimento, le cellule HD11 sono state seminate nelle apposite piastre e lasciate aderire per almeno 2 ore. Allo stesso tempo, una coltura overnight di *Salmonella* Enteritidis è stata passata in TSB fresco ed incubata per 4 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione, la sospensione batterica in fase esponenziale è stata diluita per infettare le cellule adottando una molteplicità di infezione (MOI) di 10. Il challenge ha avuto una durata di 6 ore e le cellule sono state suddivise in 4 gruppi:

- CTR: infettate con *Salmonella* Enteritidis, riceventi nessun trattamento
- OSS: infettate con *Salmonella* Enteritidis, trattate con ossitetraciclina a 32 ppm
- GEN: infettate con *Salmonella* Enteritidis, trattate con gentamicina a 2 ppm
- TIM: infettate con *Salmonella* Enteritidis, trattate con timolo a 10 ppm

Durante l'esperimento sono stati misurati in continuo il tasso di acidificazione extracellulare (ECAR) e di consumo di ossigeno (OCR) tramite il saggio Seahorse (Agilent). Come analisi a fine esperimento è stata valutata l'espressione genica

di IL1B e IL10, oltreché lo stato di fosforilazione proteico tramite l'analisi del chinoma.

I protocolli relativi al Seahorse assay e all'analisi del chinoma sono stati seguiti secondo quanto descritto da Perry et al. (2020). L'espressione genica è stata investigata tramite digital PCR (dPCR). L'RNA è stato estratto seguendo il protocollo del kit RNeasy® Mini e sono stati diluiti 1:100 per IL1B e 1:10 per IL10. L'analisi è stata eseguita utilizzando il sistema QIAcuity One Digital PCR (Qiagen) con il kit QIAcuity OneStep Advanced Probe (Qiagen), impiegando i primer e le sonde elencati nella Tabella 1.

IL1β	Sonda	5'-(FAM)-CCACACTGCAGCTGGAGGAAGCC-(TAMRA)-3'
	F	5'-GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG-3'
	R	5'-TGTCGATGTCCCGCATGA-3'
IL10	Sonda	5'-(FAM)-CGACGATTCGGCGCTGTACC-(TAMRA)-3'
	F	5'-CATGCTGCTGGCCTGAA-3'
	R	5'-CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG-3'

Tabella 1. Primer e sonde utilizzate.

Statistica

Per l'analisi del chinoma, è stato eseguito un t-test appaiato unilaterale tra i trattamenti ed il controllo per ciascun peptide, utilizzando il software PIIKA 2.5. Il saggio metabolico Seahorse ed i dati di espressione genica sono stati analizzati con GraphPad Prism v. 9.4.1. Per il primo è stato eseguito un test ANOVA a due vie, seguito da un test di confronto multiplo di Šidák. Per l'analisi dell'espressione genica è stato eseguito un t-test non appaiato.

RISULTATI

Concentrazioni minime inibitorie delle sostanze testate

Di seguito sono riportate le MIC ottenute per le sostanze testate:

- OSS: >32 ppm (range testato 0.25–32 ppm)
- GEN: 4 ppm (range testato 0.25–32 ppm)
- TIM: 280 ppm (range testato 8.75–1120 ppm)

Assay metabolico Seahorse

Le cellule del gruppo CTR (Figura 1A, 1B, 1C) hanno mostrato un picco di OCR ed ECAR dopo 3 ore dall'inizio dell'infezione, seguito da un calo di entrambi i parametri ed una stabilizzazione dell'OCR. Alla fine dell'esperimento (6 ore post-infezione) è stato invece visualizzato un secondo picco di ECAR. Combinando i due parametri, le cellule sono risultate essere in uno stato metabolico energetico. Nel gruppo GEN (Figura 1A), dopo 2 ore di infezione è stata osservata una differenza significativa di OCR, mantenuto poi basale e costante durante tutto l'esperimento. Lo stesso andamento basale è stato osservato per l'ECAR. Le cellule alla fine dell'esperimento erano in uno stato metabolico quiescente. L'andamento di OCR and ECAR delle cellule del gruppo OSS (Figura 1B) è stato paragonabile al gruppo CTR, trovandosi anch'esse in uno stato metabolico energetico alla fine dell'esperimento.

Infine, il gruppo TIM (Figura 1C) ha mostrato un trend anticipato di entrambi i parametri. Inoltre, a partire dalle 5 ore post-infezione c'è stato anche un calo significativo di ECAR. Le cellule trattate con timolo sono quindi risultate essere in uno stato metabolico aerobico alla fine dell'infezione. In base ai risultati ottenuti, si è deciso di analizzare l'espressione genica e il chinoma solamente del gruppo GEN e TIM.

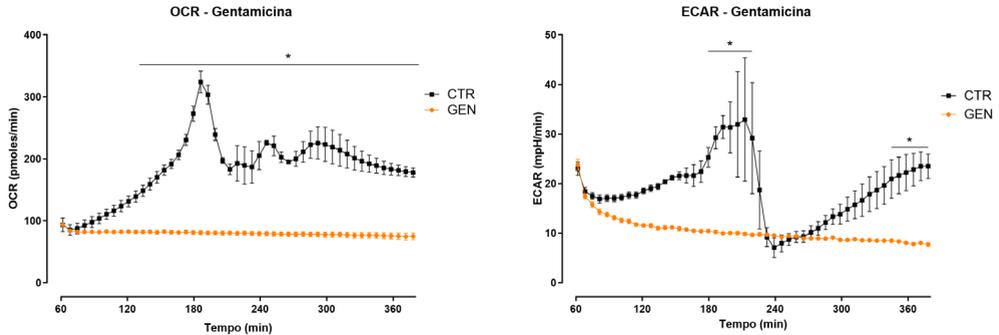


Figura 1A. Tasso di consumo di ossigeno (OCR) e di acidificazione extracellulare (ECAR) in cellule HD11 infettate con *Salmonella* Enteritidis e trattate con gentamicina (GEN) o senza (CTR) per 6 ore. Le letture partono da 60 min poiché prima lo strumento richiede una calibratura interna. I dati sono espressi come media \pm SEM (n = 3) e gli asterischi indicano una significatività statistica con $p \leq 0.05$.

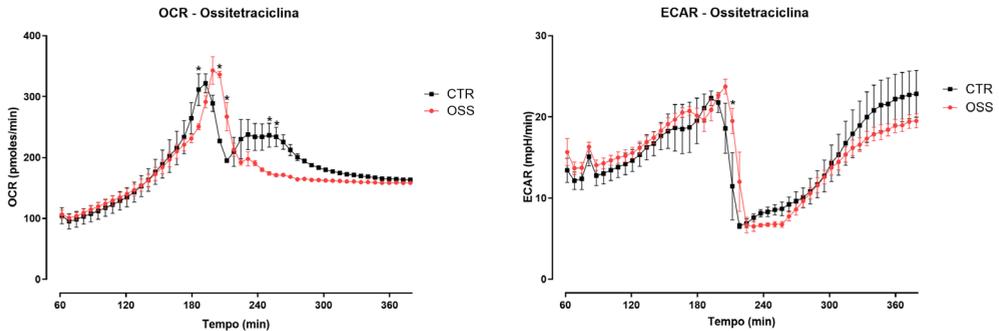


Figura 1B. Tasso di consumo di ossigeno (OCR) e di acidificazione extracellulare (ECAR) in cellule HD11 infettate con *Salmonella* Enteritidis e trattate con ossitetraciclina (OSS) o senza (CTR) per 6 ore. Le letture partono da 60 min poiché prima lo strumento richiede una calibratura interna. I dati sono espressi come media \pm SEM (n = 3) e gli asterischi indicano una significatività statistica con $p \leq 0.05$.

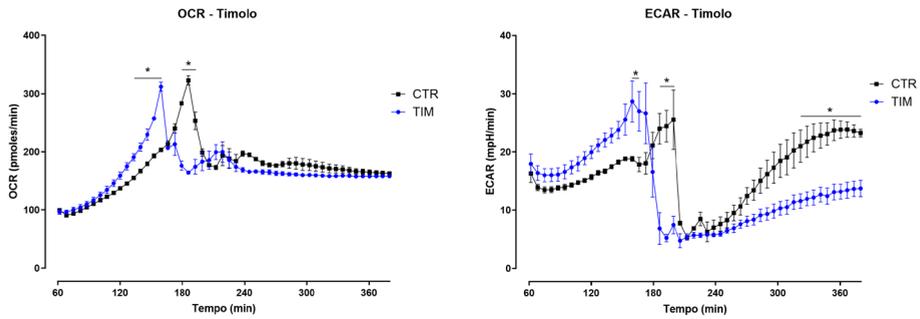


Figura 1C. Tasso di consumo di ossigeno (OCR) e di acidificazione extracellulare (ECAR) in cellule HD11 infettate con *Salmonella* Enteritidis e trattate con timolo (TIM) o senza (CTR) per 6 ore. Le letture partono da 60 min poiché prima lo strumento richiede una calibratura interna. I dati sono espressi come media \pm SEM (n = 3) e gli asterischi indicano una significatività statistica con $p \leq 0.05$.

Espressione genica

L'espressione genica di IL1B è risultata significativamente aumentata nelle cellule del gruppo TIM e del gruppo GEN (Figura 2A). Un aumento numerico dell'espressione genica di IL10 ($p=0.260$) è stato osservato nel gruppo TIM, mentre un aumento significativo è stato rilevato nel gruppo GEN (Figura 2B).

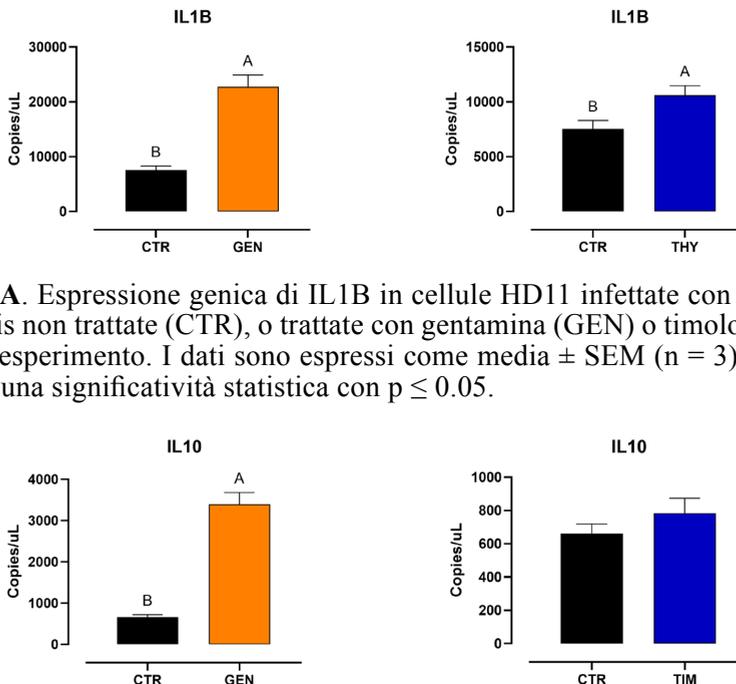


Figura 2A. Espressione genica di IL1B in cellule HD11 infettate con *Salmonella* Enteritidis non trattate (CTR), o trattate con gentamina (GEN) o timolo (TIM) alla fine dell'esperimento. I dati sono espressi come media \pm SEM (n = 3) e le lettere indicano una significatività statistica con $p \leq 0.05$.

Figura 2B. Espressione genica di IL10 in cellule HD11 infettate con *Salmonella* Enteritidis non trattate (CTR), o trattate con gentamina (GEN) o timolo (TIM) alla fine dell'esperimento. I dati sono espressi come media \pm SEM (n = 3) e le lettere indicano una significatività statistica con $p \leq 0.05$.

Analisi del chinoma

L'analisi statistica della fosforilazione proteica ha evidenziato che uno dei pathway immunometabolici maggiormente influenzati dal trattamento con timolo e gentamicina è il *C-type lectin receptor signaling pathway* (map04625; Figura 3). Nelle cellule del gruppo TIM, rispetto a quelle trattate con gentamicina (gruppo GEN), JUN, PLCG2, PRKCD e CASP1 sono risultate le proteine più attivamente coinvolte. Altre proteine, tra cui CALM, NFATC3, SRC e PIK3CB, hanno presentato differenze di fosforilazione tra i gruppi; tuttavia, sulla base del sito modificato, non è stato possibile stabilire con certezza se queste differenze corrispondessero a un aumento o a una riduzione della loro attivazione.

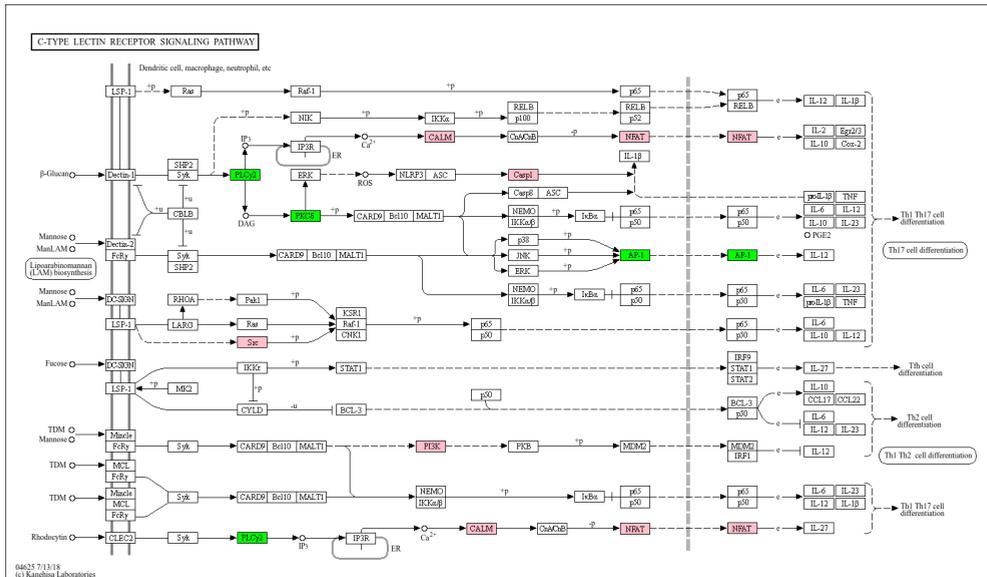


Figura 3. KEGG *C-type lectin receptor signaling pathway* (map04625) con indicati i principali peptidi significativamente modificati in cellule HD11 infettate con *Salmonella* Enteritidis trattate con timolo rispetto a cellule trattate con gentamicina. Il colore verde indica proteine significativamente attivate, il colore rosso proteine significativamente deattivate, mentre il colore rosa indica che non sono state trovate informazioni disponibili riguardo il sito modificato oppure che più siti della stessa proteina sono risultati significativamente influenzati con conseguente attivazione e deattivazione della proteina stessa.

DISCUSSIONE

Lo studio del meccanismo di azione delle molecole per combattere agenti patogeni come *Salmonella* è diventato di fondamentale importanza prima di intervenire sull'animale. In questo studio l'interazione ospite-patogeno è stata investigata con cellule immunitarie di pollo infettate con *Salmonella* Enteritidis e trattate con antibiotici o timolo.

Tramite il saggio Seahorse sono stati evidenziati diversi effetti immunometabolici dati dai diversi trattamenti sulle cellule di macrofago. Le cellule trattate con

gentamicina si sono trovate in uno stato quiescente alla fine dell'esperimento poiché l'antibiotico efficace ha probabilmente aiutato le cellule a combattere l'infezione anche a dosi sub-inibitorie (1/2 di MIC). Al contrario, l'antibiotico non efficace (ossitetraciclina) non ha avuto nessun effetto rispetto alle cellule non trattate, le quali si sono trovate in uno stato energetico che, se prolungato, può portare a stress ossidativo e danni metabolici (effetto Warburg). Infine i macrofagi trattati con timolo a dosi sub-inibitorie (1/28 di MIC) si sono trovati in uno stato metabolico aerobico, avendo avuto una risposta al challenge più rapida delle cellule non trattate durante tutto l'esperimento e risolvendo l'infezione anticipatamente tramite un minore stato infiammatorio alla fine dell'esperimento. Lo stato aerobico è correlato al fenotipo M2: questi macrofagi hanno un'attività perlopiù infiammatoria ed immunomodulatoria, generando elevate quantità di ATP tramite il ciclo TCA e la fosforilazione ossidativa (Viola et al., 2019). In base ai dati ottenuti da questa analisi si è deciso di proseguire l'approfondimento del meccanismo d'azione di timolo e gentamicina. Queste due molecole, al contrario dell'antibiotico non efficace, hanno mostrato un effetto immunometabolico sull'interazione ospite-patogeno. Fenomeni di resistenza all'ossitetraciclina sono comuni in ceppi di campo di *Salmonella* (Nair et al., 2018) e l'antibiotico non è in grado di suscitare alcun effetto anche nell'ospite.

Per confermare i dati osservati con il saggio Seahorse è stata valutata l'espressione genica di una citochina pro-infiammatoria (IL1B) e una citochina regolatoria (IL10). L'espressione di IL1B nelle cellule trattate con timolo è aumentata significativamente, spiegando il trend anticipato osservato durante il saggio Seahorse. La risoluzione dell'infezione rispetto al controllo potrebbe ulteriormente essere giustificata dall'aumento dell'espressione genica di IL10, sebbene non significativo. L'aumento delle due citochine osservato nelle cellule trattate con gentamicina potrebbe confermare la risoluzione dell'infezione durante l'esperimento.

Per approfondire lo stato fosforilativo delle cellule trattate con timolo e gentamicina è stata infine effettuata un'analisi del chinoma per indagare i pathways maggiormente influenzati dal trattamento con timolo rispetto a quello con gentamicina. Tra questi è stato evidenziato il *C-type lectin receptor signaling pathway*: nei macrofagi, i recettori di tipo lectina C sono coinvolti nel riconoscimento e nella fagocitosi del batterio (Sekelova et al., 2017), svolgendo un ruolo cruciale nella difesa dell'ospite contro le infezioni da *Salmonella*. Le cellule trattate con timolo hanno mostrato una maggiore attivazione di diverse proteine coinvolte in pathway il cui esito finale è la produzione di IL1B e IL10, nonché la differenziazione di cellule Th17. Queste cellule prevengono la disseminazione di *Salmonella*, favorendo una risposta infiammatoria controllata ed il contenimento del patogeno, e rafforzano la barriera intestinale (Pan et al., 2024).

CONCLUSIONI

Lo studio dell'interazione ospite-patogeno durante questo esperimento *in vitro* su macrofagi di pollo ha permesso di indagare gli effetti immunometabolici delle molecole testate a concentrazioni sub-inibitorie. In particolare, la gentamicina potrebbe aiutare l'ospite a rispondere all'aggressione batterica, evitando una reazione eccessiva dei suoi processi immunometabolici. Il timolo si è dimostrato

in grado di accelerare la risposta dei macrofagi contro l'infezione batterica anche a concentrazioni molto inferiori alla MIC, probabilmente aumentando la produzione di IL1B. Infatti, dal punto di vista metabolico, la glicolisi rappresenta il modo più rapido per le cellule di produrre energia e intermedi necessari a combattere un'infezione batterica. La riduzione del metabolismo glicolitico e il conseguente stato energetico inferiore delle cellule alla fine dell'esperimento potrebbero indicare un superamento più precoce dell'infezione. Conoscere approfonditamente il meccanismo di azione delle molecole utilizzate per controllare i patogeni nella produzione avicola sta diventando di fondamentale importanza per evitare sprechi di risorse ed instaurarsi di resistenze.

BIBLIOGRAFIA

1. Grilli E, Tugnoli B, Formigoni A, Massi P, Fantinati P, Tosi G and A Piva. (2011). Microencapsulated sorbic acid and nature-identical compounds reduced *Salmonella Hadar* and *Salmonella Enteritidis* colonization in experimentally infected chickens. *Poult. Sci.* 90: 1676–1682.
2. Peng L, Matthijs MGR, Haagsman HP and EJA Veldhuizen. (2018). Avian pathogenic *Escherichia coli*-induced activation of chicken macrophage HD11 cells. *Dev. Comp. Immunol.* 87: 75–83.
3. Rossi B, Toschi A, Piva A and E Grilli. (2020). Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutr. Res. Rev.* 33: 218–234.
4. Perry F, Johnson C, Aylward B and RJ Arsenault. (2020). The Differential Phosphorylation-Dependent Signaling and Glucose Immunometabolic Responses Induced during Infection by *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Heidelberg* in Chicken Macrophage-like cells. *Microorganisms* 8: 1041.
5. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T and A Castegna. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Front. Immunol.* 10: 1462.
6. Nair DVT, Venkitanarayanan K and A Kollanoor Johny. (2018). Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods* 7, 167.
7. Sekelova Z, Stepanova H, Polansky O, Varmuzova K, Faldynova M, Fedr R, Rychlik I and L Vlasatikova. (2017). Differential protein expression in chicken macrophages and heterophils in vivo following infection with *Salmonella Enteritidis*. *Vet. Res.* 48: 35.
8. Pan J, Wei R, Xu P, Liu Y, Li C, Ding G, Fan J, Li Y, Yu J and P Dai. (2024). Progress in the application of *Salmonella* vaccines in poultry: A mini review. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 278: 110855.

“BLACK PROVENTRICULUS” NEI BROILER: RILIEVI DIAGNOSTICI DI RECENTI CASI CLINICI ITALIANI E IPOTESI EZIOPATOGENETICHE

Giovanardi D.¹, Garbuio M.², Zandonà L.², Zanardello C.³, Vedana M.², Baglioni A.², Viel L.², Laconi A.⁴, Piccirillo A.⁴, Bano L.¹

¹Laboratorio Tre Valli, viale A. Veronesi 5, 37132 San Michele Extra (VR), Italia;

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

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Istopatologia (SCS3 Diagnostica Specialistica, Istopatologia ed Entomologia sanitaria), Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia;

⁴Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova (UNIPD), viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD), Italia.

Summary

Avian colibacillosis refers to any localized or systemic infection caused wholly or partly by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). It includes colisepticemia, airsacculitis, swollen-head syndrome, peritonitis, salpingitis, osteomyelitis/synovitis, and, in young birds, omphalitis/yolk sac infection. Over the past decade, a new syndrome known as “Black Proventriculus-BP,” caused by APEC, has been recognised in two different broiler breeding farms (Wang et al., 2015; Talebi et al., 2020). In Italy in 2025, we observed 17 clinical cases of BP in broiler chicks aged 3 to 6 days. One hundred and seventy-two chicks were necropsied and submitted for bacteriology and histological examination. 30.6 % of chicks displayed the classical BP lesion, while 40.70 % showed a combination of pericarditis and omphalitis/yolk sac infection. *Escherichia coli* of different serotypes (O88, O45, O15, O1) was isolated as the sole bacteria from the mucosa of the proventriculus in BP lesions. The isolated strains were mainly classified as weak biofilm producers, with only one strain identified as a moderate biofilm producer. The histological investigation in additional clinical cases revealed diffuse erosive bacterial proventriculitis with mild ectasia of the submucosal glands, cellular debris, necrotic cells, and bacteria in the lumen. There was vascular congestion and bacteria in the lumen of the vessels, as well as fibrinous bacterial serositis with the presence of rare macrophages and heterophils.

INTRODUZIONE

La colibacillosi aviare è un'infezione localizzata o sistemica causata da *Escherichia coli* (*E. coli*) aviari patogeni (APEC – *Avian Pathogenic Escherichia coli*). Tra le sindromi sono incluse la colisetticemia, la sindrome della testa gonfia, la peritonite, la salpingite, l'osteomielite/sinovite e, nei giovani broiler, l'onfalite/infezione del sacco vitellino. I sierotipi di APEC maggiormente coinvolti sono O1, O2 e O78. Nell'ultimo decennio, una nuova sindrome nota come “*Black proventriculus-BP*”, causata da APEC, è stata descritta in due diversi lavori scientifici in allevamenti di polli riproduttori. Nel primo studio, gli autori cinesi indicano che APEC sierotipo O142 è stato l'agente eziologico di un caso clinico di BP in soggetti di sette giorni (Wang et al., 2015). Nel 2018, il secondo report in giovani polli riproduttori, di età compresa tra 3 e 6 giorni, in Iran, riporta l'iso-

lamento di APEC dello stesso sierotipo ed analoghe lesioni anatomopatologiche (Talebi et al. 2020). Ad oggi, l'unica segnalazione di *BP* in Italia nei broiler è stata riportata da Brunetta durante il congresso nazionale della Società di Patologia Aviare nel 2019 con due casi clinici, uno del 2013 e uno del 2019 (Brunetta, 2019). Il presente studio vuole descrivere ed approfondire recenti casi italiani di *BP* in allevamenti commerciali di broiler e fornire ipotesi eziopatogenetiche sull'insorgenza della sindrome.

MATERIALI E METODI

Campionamento

In Italia, nel primo semestre del 2025, sono stati osservati 17 casi clinici di *BP* in pulcini da carne di età compresa tra 3 e 6 giorni. In totale 172 soggetti sono stati sottoposti a necropsopia, esame batteriologico ed istologico.

Isolamento ed identificazione

Visceri (sacco vitellino, parete proventricolare, cervello, fegato e milza) e tamponi (da essudato pericardico e mucosa proventricolare) prelevati sui soggetti esaminati sono stati sottoposti ad indagine batteriologica che comprendeva l'isolamento su agar (blood agar base – Thermo Fisher Scientific, Regno Unito) addizionato con sangue di montone (5%) ed incubazione a 37 ± 1 °C per 24 ± 3 ore in condizioni di aerobiosi. L'identificazione di *Escherichia coli* è stata eseguita con metodiche biochimiche: galleria commerciale miniaturizzata Rapid 20 E (bioMérieux, France) e inoculo in *Triple Iron Sugar* agar (Thermo Fisher Scientific, Regno Unito) incubati come già precedentemente indicato o mediante spettrometria di massa con analisi MALDI TOF MS utilizzando lo strumento Sirius Biotyper® (Bruker Daltonics, Bremen, Germania). La tipizzazione sierologica è stata eseguita dal - Reparto Tecnologie Biologiche Applicate - Batteriologia Specializzata - Laboratorio Batteriologia Specializzata di IZSLER con il metodo di prova *MP 01/175 rev. 0 – 2012* che consente l'identificazione dei sierogruppi: 1, 2, 5, 8, 9, 15, 18, 20, 22, 26, 45, 49, 55, 64, 78, 86, 88, 101, 103, 111, 113, 118, 128, 138, 139, 141, 147, 149, 153 e 157. Per la singola agglutinazione relativa al sierotipo O142 è stato utilizzato un antisiero commerciale (SSI Diagnostica, Danimarca).

Esame istologico

Campioni di proventriglio da quattro casi clinici sono stati prelevati, fissati in formalina tamponata al 10% per 48 ore e inviati al Laboratorio di istopatologia dell'Istituto Zootecnico Sperimentale delle Venezie per l'analisi istopatologica.

Produzione di biofilm

Le analisi sono state eseguite presso il Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA) dell'Università di Padova. I campioni sono stati processati secondo il protocollo di Laconi *et. al* (2023). Per ogni ceppo, le analisi sono state eseguite sia a 37 °C e 42 °C. Per entrambe le temperature, ogni ceppo è stato testato in triplicato in due esperimenti distinti (sei repliche per campione). In breve, per ciascun ceppo, 200 µL di una sospensione con torbidità pari a 1 sulla scala di McFarland sono stati inoculati in triplicato in una micropiastra sterile da 96 pozzetti in polistirene (Sarstedt, Nümbrecht, Germania), quindi incubati su agitatore per 24 ore. Al termine dell'incubazione, i batteri sono stati fissati con 200 µL di metanolo, colorati con 200 µL di violetto di cristallo (Fisher Scientific, Waltham, USA) e successivamente risolubilizzati con 160 µL di acido acetico glaciale al

33%. Le piastre sono state lette tre volte, a intervalli di 5 minuti, utilizzando uno spettrofotometro (Multiskan™ GO, Fisher Scientific, USA) a 570 nm. Il valore di assorbanza (DO) di ciascun isolato (DO_1) è stato calcolato come media aritmetica delle repliche nei due esperimenti. Sono stati inoltre calcolati la deviazione standard e il coefficiente di variazione (CV) per valutarne la robustezza ($CV < 0,5$). I valori di DO_1 sono stati confrontati con la media dell'assorbanza del controllo negativo (DO_{CN}), e i ceppi sono stati successivamente classificati in quattro categorie: non produttori di biofilm ($DO_1 \leq DO_{CN}$); deboli produttori di biofilm ($DO_{CN} < DO_1 \leq 2 \times DO_{CN}$); produttori moderati di biofilm ($2 \times DO_{CN} < DO_1 \leq 4 \times DO_{CN}$); forti produttori di biofilm ($DO_1 > 4 \times DO_{CN}$).

RISULTATI

Sintomatologia clinica

Nei 17 allevamenti interessati da *BP*, l'età dei soggetti colpiti era compresa tra 3 e 6 giorni, con una media di 4,71. La mortalità complessiva durante la prima settimana, non solo per *BP*, variava tra 0,58 % e 9,15 %, con una media di 2,61 (Tab.1). In capannone i pulcini venivano trovati morti senza segni clinici premonitori.

Esame necroscopico

Il 30.6% dei pulcini esaminati presentava la classica lesione di *BP*, e il 40.7 % una combinazione di pericardite e/o onfalite/infezione del sacco vitellino (Tabella 1). Costante l'annerimento del proventriglio, con un colore diffuso dell'organo variabile da nero a grigio a verde attraverso varie sfumature (Figura 1).

Isolamento ed identificazione

Escherichia coli non emolitico appartenente a diversi sierotipi (O88, O45, O15, O1 e non tipizzabile), è stato isolato quasi sempre in purezza dalla mucosa dello stomaco ghiandolare nelle lesioni da *BP* e in altri organi indagati a seconda del caso clinico (Tab.1). Tutti i ceppi sono risultati indolo produttori, lattosio positivi, con viraggio acido (becco giallo/fondo giallo) e produzione di gas in TSI agar. Nessun ceppo è risultato produttore di idrogeno solforato (H_2S). La massiva presenza di *E. coli* sulla mucosa dei proventrigli era associata a quella altrettanto importante nel cervello, essudato pericardico, fegato, milza e contenuto del sacco vitellino.

Produzione di biofilm

Sono stati testati 5 ceppi, tutti classificati fenotipicamente come deboli produttori di biofilm sia a 37 °C che a 42 °C, a parte un ceppo che è risultato moderato produttore a 37 °C (Tab. 1).

Esame istologico

In tutti i campioni esaminati l'esame istologico ha evidenziato diffusa proventricolite catarrale superficiale con rari focolai di erosione della mucosa. La componente ghiandolare profonda si presentava lievemente ectasica, con scarso materiale necrotico frammentato a detriti cellulari nel lume (Figura 2). I vasi apparivano congesti e con presenza di bacilli a sede endovasale (Figura 3). A carico della sierosa della quasi totalità dei soggetti esaminati è stato evidenziato un grave e diffuso processo fibrinoso eterofilico macrofagico con presenza di bacilli sia in sede extracellulare che fagocitati dai macrofagi (Figura 4).

Figura 1. Broiler di 3 giorni, annerimento del proventriglio con una colorazione diffusa dell'organo variabile da nero a grigio attraverso varie sfumature.



Figura 2. Ectasia della componente ghiandolare profonda con scarso materiale necrotico frammisto a detriti cellulari nel lume (Ematossilina Eosina, 10x).

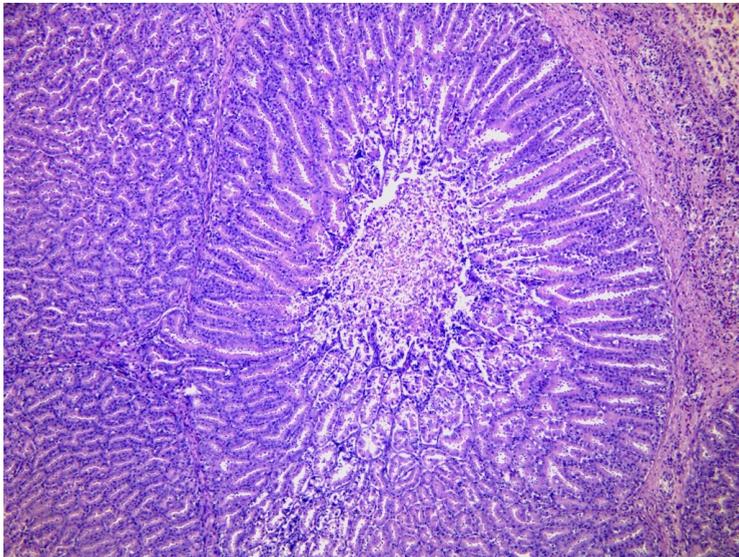


Figura 3. Presenza di bacilli a sede endovasale (Ematossilina Eosina, 63x).

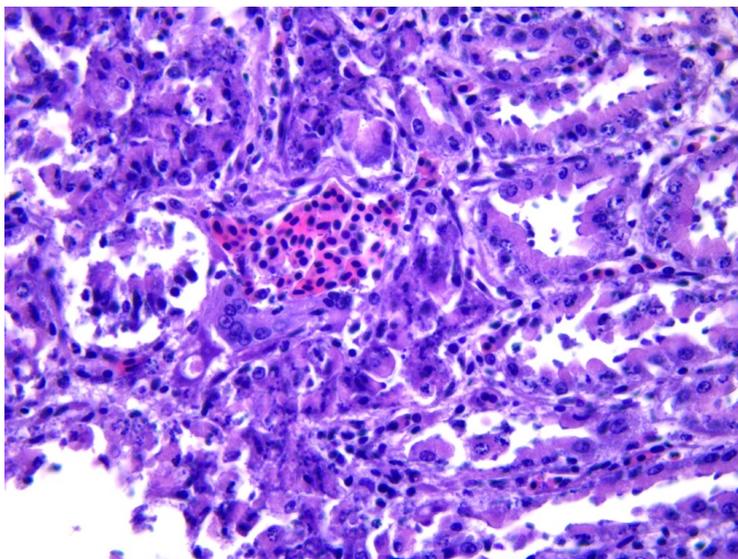
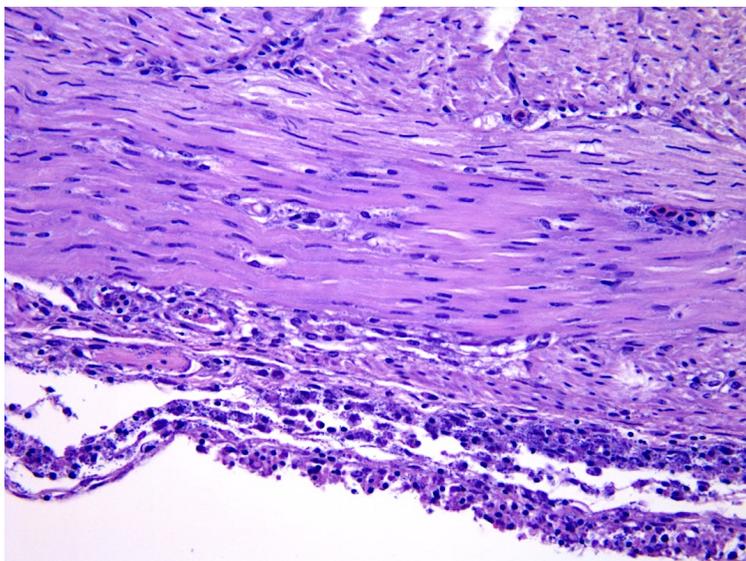


Figura 4. Grave e diffuso processo fibrinoso eterofilico macrofagico con presenza di bacilli sia a sede extracellulare che fagocitati dai macrofagi (Ematossilina Eosina, 40x).



Caso clinico	Età soggetti (giorni)	% Mortalità cumulativa prima settimana	# totale soggetti esaminati	# totale soggetti con BP	# totale soggetti con altre lesioni AP	Sierotipo <i>E. coli</i>	Esame istologico	Produzione di biofilm a 37 °C	Produzione di biofilm a 42 °C
1	3	0,58	10	4	0	O45	Eseguito	Moderata	Debole
2	6	1,93	10	7	3	O88	n.e.	Debole	Debole
3	5	0,88	10	2	2	O45	n.e.	Debole	Debole
4	3	1,22	10	1	1	O15	n.e.	Debole	Debole
5	4	0,71	10	3	6	NT	n.e.	n.e.	n.e.
6	4	0,78	15	5	7	NT	n.e.	Debole	Debole
7	6	4,05	15	1	10	NT	n.e.	n.e.	n.e.
8	5	2,40	6	3	3	O88	n.e.	n.e.	n.e.
9	4	9,18	15	4	4	O45	n.e.	n.e.	n.e.
10	5	2,75	10	2	1	O1	n.e.	n.e.	n.e.
11	5	3,45	2	2	0	O88	n.e.	n.e.	n.e.
12	5	4,00	11	5	11	n.e.	Eseguito	n.e.	n.e.
13	6	3,00	10	4	10	n.e.	Eseguito	n.e.	n.e.
14	5	2,50	10	5	10	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
15	4	3,00	9	3	9	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
16	5	3,20	9	5	9	n.e.	Eseguito	n.e.	n.e.
17	5	3,00	10	6	10	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
	Media	Media	Totale	Totale	Totale				
	4,71	2,61	172	62	70				

Tabella 1. Risultati degli approfondimenti diagnostici condotti sui 172 pulcini indagati. Legenda: n.e. non eseguito, NT non tipizzabile.

DISCUSSIONE

I recenti casi di *BP* osservati nel 2025 non sono da considerarsi una manifestazione anatomo-patologica emergente, ma riemergente in quanto già segnalata nel nostro paese nel 2013 e 2019 (Brunetta, 2019) e da Giovanardi nel 2020 e 2024 (dati non pubblicati). A livello internazionale i primi casi sono stati segnalati in Cina (Wang et al., 2015) e in Iran (Talebi et al., 2020) ma anche l'atlante americano della AAAP "Gross Pathology of Avian Diseases Text and Atlas" (Abdul Aziz et al., 2018) presenta una foto della lesione in broiler di 6 giorni tale da far ipotizzare che *BP* sia stata osservata nel decennio precedente anche nel continente nord americano. L'unico agente eziologico di natura batterica isolato dalla mucosa degli stomaci ghiandolari colpiti in elevata carica è *E. coli*, in alcuni casi abbinato a una lieve quantità *Enterococcus faecalis* (Giovanardi, dati non pubblicati). Dalla bibliografia si evince come quest'ultima specie batterica sia in grado di potenziare la patogenicità/virulenza di *E. coli* quando presente contemporaneamente nel sito di lesione (Walker GK et al., 2020). Le caratteristiche biochimiche dei ceppi di *E. coli* non differivano tra gli isolati: tutti producevano indolo, nessun ceppo si presentava lattosio negativo o produceva idrogeno solforato H₂S quando inoculato in TSI agar. A livello di sierotipizzazione, invece, i ceppi sono risultati appartenere a diversi sierotipi: O88, O45, O15 e O1 o

non tipizzabili. Nessun ceppo esaminato in questa indagine è risultato appartenente al sierotipo O142, il sierotipo isolato nei due casi clinici pubblicati (Wang et al. 2015; Talebi et al., 2020) , o ai sierotipi O2 e O78 a cui appartengono la maggior parte di APEC isolati nel pollo. La sopravvivenza e la colonizzazione di *E. coli* in ambiente gastrico è il fattore eziopatologico determinante di questa manifestazione. Alcuni ceppi isolati sono stati anche identificati come produttori di biofilm in vitro e, probabilmente, lo sono anche a livello gastrico. Nell'uomo, infatti, è stato dimostrato che *E. coli* può resistere al pH acido dello stomaco per poi essere veicolato nell'intestino (Pienaar et al., 2019).

Il presente studio indica come la colonizzazione di *E. coli* della parete e mucosa gastrica dei pulcini possa avvenire invece per via ematogena, direttamente dal sacco vitellino attraverso il circolo. L'esame istologico infatti evidenzia la presenza di bacilli nel lume dei vasi sanguigni degli stomaci ghiandolari. Uno dei due sierotipi maggiormente isolati in questo studio è stato O88, lo stesso ritrovato in precedenza nei primi episodi osservati in Italia (Brunetta, 2019). Questo sierotipo è in grado di causare gravi lesioni a livello intestinale in anatre pechino inoculate sperimentalmente per via orale a seguito di adesione e colonizzazione dell'epitelio intestinale ,da cui può successivamente disseminare attraverso il torrente circolatorio (Chong et al., 2022). Dalle lesioni erosive della mucosa gastrica evidenziate istologicamente dai casi di *BP* sostenuti da sierotipo O45 in questo studio e da Brunetta (2019) per il sierotipo O88, è possibile ipotizzare che questi sierotipi specifici di *E. coli* siano in grado di provocare a questo livello lesioni analoghe a quelle intestinali osservate nelle anatre pechino. Secondo Wang et al. (2015) e Talebi et al. (2020), l'annerimento *intra vitam* e *post mortem* dei proventrigli sarebbe da attribuire alla presenza di indolo nel tessuto colpito. L'indolo di per sé è un composto incolore ma in presenza di alcuni batteri e di agenti ossidanti può essere convertito in pigmenti che variano dal verde al marrone-nero (Vanderzant et al., 1987). D'altra parte, alcuni visceri come fegato, milza e polmone colonizzati da *E. coli*, possono sviluppare una colorazione verdastra a seguito dell'esposizione all'aria per la produzione di indolo da parte di questa specie batterica, colorazione più intensa all'aumentare del tempo trascorso dal decesso (AAVV. 2020). Dal punto di vista epidemiologico questi episodi di *BP* osservati unicamente nella prima settimana di vita dei broiler non escludono una possibile trasmissione verticale di *E. coli* (Giovanardi et al., 2005). La natura virale delle lesioni di *BP* sembra essere esclusa da Brunetta (2019) e anche dall'assenza di corpi inclusi intranucleari o intracitoplasmatici nella parete dei proventrigli. Sarà comunque necessario approfondire questo aspetto eziologico.

CONCLUSIONI

I soggetti presentanti *BP* sono deceduti a causa di colisettemia. Non sono ancora chiari i meccanismi del tropismo di alcuni ceppi di *E. coli* per il proventriglio e alcuni dei ceppi isolati saranno sottoposti a sequenziamento genomico al fine di identificare eventuali fattori di virulenza specifici così da classificarli come APEC. In questo studio sono stati osservati nello stesso caso clinico soggetti deceduti che presentavano solo *BP* e altri solo pericardite, onfalite e più in generale polisierosite, come documentato da Brunetta (2019), Talebi et al. (2020) e Wang et al. (2015). In tali casi, la colonizzazione del proventricolo avviene probabilmente a seguito di assorbimento enterico di *E. coli* dal sacco vitellino e diffusione al proventricolo at-

traverso la retroperistalsi intestinale, che può diventare preponderante in periodi di digiuno, anche breve. Nel caso di lesioni di polisierosite con pericardite, invece, la via di infezione batterica prevalente è probabilmente quella respiratoria. In tale eventualità, i soggetti probabilmente deperiscono prima di sviluppare *BP* oppure questa lesione viene osservata in lieve entità. Per confermare tali ipotesi sarà necessario effettuare prove sperimentali con differenti vie di infezione, utilizzando un solo ceppo di campo isolato da un episodio di *BP*.

BIBLIOGRAFIA

1. AAVV. (2020). *Diseases of Poultry*. 14th edition. American Association of Avian Pathologists, Allen Press.
2. Abdul Aziz T, and HJ Barnes. (2018). *Gross Pathology of Avian Diseases – Text and Atlas*. American Association of Avian Pathologists, Allen Press. Neonatal Septicemia; pp. 8.
3. Brunetta M. (2019). Episodi di Black Proventriculus in Broiler Commerciali. *Atti LVIII Convegno Annuale Società Italiana di Patologia Aviaria*; pp. 35–38.
4. Giovanardi D, Campagnari E, Ruffoni Sperati L, Pesente P, Ortali G, and V Furlattini. (2005). Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. *Avian Pathology* 34: 313–318.
5. Laconi A, Tolosi R, Apostolakis I, and A Piccirillo. (2023). Biofilm formation ability of ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* isolated from the broiler production pyramid. *Antibiotics* 12: 155.
6. Li C, Li S, Liu J, Cai H, Liu G, Deng X, and W Chang. (2022). *Escherichia coli* O88 induces intestinal damage and inflammatory response through the oxidative phosphorylation and ribosome pathway in Pekin ducks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.
7. Pienaar JA, Sing A, and TG Barnard. (2019). Acid-happy: Survival and recovery of enteropathogenic *Escherichia coli*(EPEC) in simulated gastric fluid. *Microbial Pathogenesis* 128: 396–404.
8. Talebi A, Tukmechi A, Ali-Asghar T, and S Moradi. (2020). Black proventriculus in Cobb 500 broiler breeders. *Veterinary Research Forum* 11(4): 427–429.
9. Vanderzant C, Savell JW, Hamby PL, Acuff GR, Cox AN, and JS Bailey. (1987). Indole-induced, green to brown-black pigment formation by an *Acinetobacter* strain from beef. *Journal of Food Protection* 50(6): 485–486.
10. Walker GK, Suyemoto MM, Gall S, Chen L, Thakur S, and LB Borst. (2020). The role of *Enterococcus faecalis* during co-infection with avian pathogenic *Escherichia coli* in avian colibacillosis. *Avian Pathology* 49(6): 589–599.
11. Wang X, Cao C, Huan H, Zhang L, Mua X, Gao Q, Dong X, Song G, and X Liu. (2015). Isolation, identification, and pathogenicity of O142 avian pathogenic *Escherichia coli* causing black proventriculus and septicemia in broiler breeders. *Infection, Genetics and Evolution* 32: 23–29.

METAPNEUMOVIRUS AVIARE E VOLATILI SELVATICI: AGGIORNAMENTI EPIDEMIOLOGICI E METANALISI DEI DATI SU SCALA GLOBALE

Graziosi G.¹, Lupini C.¹, Quaglia G.¹, Lizzi G.¹, Tomasoni R.¹, Catelli E.¹

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

Summary

Avian metapneumovirus (aMPV) is an important pathogen affecting poultry, particularly turkeys and chickens, on a global scale. Molecular or serological evidence of aMPV infection has also been reported in various wild bird species. Among these, especially migratory birds have been hypothesized to play a role in the virus epidemiology. The conducted systematic review aimed to synthesize published data (1990-2025) on aMPV in wild birds. To identify relevant studies, literature searches were conducted across four databases, namely PubMed, Scopus, CAB Direct and Web of Science, along with screening of reference lists of the retrieved publications. A random-effect model was applied to estimate pooled prevalence with 95% confidence intervals, following outlier identification. Subgroup analyses were performed according to geographical area of samplings, taxonomic order, genus and migration patterns of the birds surveyed to identify potential explanatory variables. A total of 22 eligible studies were identified, comprising 16 molecular and six serological surveys. After removing one outlier study, the pooled molecular prevalence was estimated at 3% (95% CI: 1-6%), with high between-study heterogeneity detected ($I^2 = 92.4\%$, $p < .0001$). Serological data yielded a pooled prevalence of 14% (95% CI: 1-39%), along with a high between-study heterogeneity ($I^2 = 98\%$, $p < .01$). Moderator analyses showed statistically significant differences according to geographical area studied, taxonomic order and genus. Overall, molecular and serological evidence suggests that some wild bird taxa could play a role in aMPV epidemiology. Particularly, wild ducks, geese, gulls and pheasants, according to scientific contributions hereby considered, proved to be susceptible to aMPV, and due to host ecology, may act as a viral carrier or reservoir. Further surveys in wild birds are encouraged for a better comprehension of the poultry/wild bird interface in aMPV epidemiology and for better characterising the virus host breadth.

INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV, famiglia *Pneumoviridae*, genere *Metapneumovirus*, specie *Metapneumovirus avis*) è associato ad una sintomatologia respiratoria in pollo e tacchino e, negli animali in disposizione, a cali della produzione e peggioramento della qualità delle uova (Cook, 2000).

Dal punto di vista antigenico e genetico, quattro sottotipi di aMPV sono ad oggi riconosciuti (A, B, C e D) (Cook, 2000). I sottotipi A e B sono quelli più diffusi a livello mondiale, con una prevalenza crescente del sottotipo B negli ultimi anni (Franzo et al., 2017; Tucciarone et al., 2018; Mescolini et al., 2021; Lupini et al., 2022). Il sottotipo C è antigenicamente e geneticamente più distante dagli altri e mostra differenze biologiche significative; è stato ad oggi rilevato in Stati Uniti, Cina e Francia, e due lignaggi, uno euroasiatico e nordamericano, sono stati identificati (Senne et al., 1997; Toquin et al., 1999;

Wei et al., 2013; Sun et al., 2014). Il sottotipo D è stato descritto unicamente in Francia nel 1985 e da allora non è stato più evidenziato. Più recentemente, aMPV geneticamente divergenti sono stati identificati in specie non domestiche, come gabbiani e parrocchetti, in Nord America (Canuti et al., 2019; Retallack et al., 2019). In seguito ai primi focolai di infezione da aMPV in Sudafrica alla fine degli anni '70 (Buys & du Preez, 1980), la diffusione a lungo raggio del virus è stata attribuita, tra altri fattori, agli uccelli selvatici e ai loro movimenti migratori da una parte all'altra del globo (Jones, 1996; Panigrahy et al., 2000; Shin et al., 2002). La comparsa di aMPV in Minnesota (Stati Uniti), uno stato con un'elevata presenza di uccelli migratori, ha fortemente contribuito a sostenere questa ipotesi (Cook, 2000b), così come anche l'andamento stagionale dei focolai di aMPV in allevamenti di tacchino americani, ed il rilevamento di aMPV in uccelli selvatici al di fuori delle aree endemiche (Shin et al., 2002; Turpin et al., 2008). Da ultimo, studi filogenetici e filodinamici su recenti focolai di infezione da aMPV-A e B verificatisi negli Stati Uniti hanno ipotizzato un possibile ruolo dei volatili selvatici migratori nell'introduzione del virus (Franzo et al., 2024; Luqman et al., 2024). Partendo da queste premesse, la presente revisione sistematica e meta-analisi fornisce un aggiornamento sulle attuali conoscenze relative alla prevalenza sieromolecolare di aMPV nelle popolazioni di uccelli selvatici su scala globale.

MATERIALI E METODI

È stata condotta una revisione sistematica della letteratura, accompagnata da una meta-analisi dei dati estratti, per stimare la sieroviro-prevalenza di aMPV negli uccelli selvatici. Per garantire l'aderenza agli standard internazionali, il processo è stato condotto seguendo il Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Protocols (PRISMA-P) (Moher et al., 2015) e il PRISMA 2020 Statement (Page et al., 2021).

Ricerca bibliografica, selezione delle pubblicazioni ed acquisizione dei dati

La prima fase del lavoro ha riguardato la ricerca bibliografica finalizzata all'individuazione della letteratura pertinente. A tal fine, sono stati consultati quattro database online (PubMed, Scopus, CAB Direct e Web of Science), utilizzando le funzioni di ricerca avanzata con parole chiave e termini MeSH (Medical Subject Headings). Ulteriori fonti bibliografiche sono state aggiunte manualmente. I documenti identificati sono stati importati in Microsoft Excel (versione 16.49) e, dopo la rimozione dei duplicati, è stato effettuato uno screening dei titoli e degli abstract applicando criteri di eleggibilità predefiniti. Poiché non è stata eseguita una valutazione del *publication bias*, è stata inclusa una sezione "Note" nel foglio Excel per annotare eventuali elementi in grado di influenzare la qualità dei dati riportati e, di conseguenza, le analisi successive.

Analisi statistica

I dati estratti dagli studi selezionati sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software R (versione 3.5.2) (R Core Team, 2018). Per i risultati ottenuti sia da studi molecolari che sierologici, le prevalenze sono state normalizzate mediante il metodo della *double-arcsine transformation* (Miller, 1978). Eventuali *outlier* sono stati individuati e rimossi attraverso un'analisi *leave-one-out*. La varianza tra studi è stata stimata applicando un modello ad effetti casuali (*random-effects model*) applicato ad un *restricted maximum-likelihood estimator* (REML). L'eterogeneità complessiva è stata quantificata mediante l'indice di inconsistenza (I^2) (Higgins & Thompson, 2002). Per esplorare i po-

tenziali fattori in grado di influenzare le stime di prevalenza, sono state condotte analisi per sottogruppi (*subgroup analyses*) in relazione all'area geografica dello studio, all'ordine e genere tassonomico degli individui campionati, al comportamento migratorio delle specie esaminate e ai metodi diagnostici impiegati.

RISULTATI

Un totale di 102 pubblicazioni è stato inizialmente identificato attraverso la consultazione dei database selezionati. Dopo la rimozione dei duplicati e l'applicazione dei criteri di eleggibilità predefiniti, sono stati inclusi in questa revisione sistematica e meta-analisi 22 studi, di cui 16 basati su analisi molecolari e 6 su analisi sierologiche.

Per quanto riguarda gli studi molecolari, sono stati analizzati complessivamente 6.855 campioni, dei quali 164 (2,4%) sono risultati positivi per aMPV.

I campioni provenivano da 63 specie di uccelli selvatici, appartenenti a 13 ordini tassonomici così rappresentati: *Anseriformes* (n = 10 articoli; 5.056 uccelli testati; 110 positivi), *Charadriiformes* (n = 7; 1.047; 8), *Columbiformes* (n = 3; 19; 11), *Falconiformes* (n = 1; 2; 1), *Galliformes* (n = 2; 123; 8), *Gruiformes* (n = 3; 210; 16), *Pelecaniformes* (n = 1; 4; 0), *Passeriformes* (n = 3; 326; 8), *Phoenicopteriformes* (n = 2; 53; 0), *Piciformes* (n = 1; 1; 0), *Psittaciformes* (n = 1; 15; 1), *Strigiformes* (n = 2; 26; 1) e *Suliformes* (n = 1; 10; 0). Complessivamente, le 63 specie testate appartenevano a 45 generi; di queste, 20 specie sono risultate positive per aMPV. I generi più frequentemente indagati sono stati *Anas* (n = 9 studi) e *Larus* (n = 7 studi). In base al comportamento migratorio delle specie campionate, 32 sono state classificate come migratrici, 21 come residenti e 10 come migranti/residenti.

Dal punto di vista metodologico, la RT-PCR convenzionale è stata utilizzata nella maggior parte degli studi (n = 10), mentre la real-time RT-PCR è stata impiegata in sei lavori. L'isolamento virale è stato tentato in cinque studi, mediante inoculazione su colture di fibroblasti embrionali di pollo (Bennett et al., 2004; Turpin et al., 2008), su uova embrionate SPF (Rizotto et al., 2019) o su organocolture di anelli tracheali di embrioni di pollo (Heffels-Redmann et al., 1998). In un caso, l'isolamento è stato eseguito tramite inoculazione di tacchini SPF di tre giorni di età (Cha et al., 2013).

La *pooled molecular prevalence* di aMPV nelle specie selvatiche è risultata pari al 3% (IC 95%: 1–6%) (Figura 1). Le *sub-group analyses* hanno evidenziato differenze significative tra le stime di prevalenza in base alla regione geografica: la prevalenza più elevata è stata riscontrata in Sud America (P: 14%; IC 95%: 1–39%), seguita dal Nord America (P: 8%; IC 95%: 2–20%) e dall'Europa (P: 8%; IC 95%: 0–4%). L'attitudine migratoria delle specie non è risultata essere influente rispetto alla stima di prevalenza molecolare.

Gli studi che hanno impiegato metodiche sierologiche riportano l'analisi complessiva di 1.646 sieri, di cui 213 (12,9%) sono risultati positivi per aMPV. I campioni provenivano da 26 specie appartenenti a dieci ordini tassonomici: *Anseriformes* (n = 1 articolo; 310 uccelli testati; 103 positivi), *Charadriiformes* (n = 3 articoli; 421; 45), *Columbiformes* (n = 1; 195; 1), *Coraciiformes* (n = 1; 1; 0), *Galliformes* (n = 3; 432; 37), *Gruiformes* (n = 1; 114; 20), *Passeriformes* (n = 1; 69; 6), *Pelecaniformes* (n = 2; 69; 1), *Phoenicopteriformes* (n = 1; 30; 0) e *Strigiformes* (n = 1; 3; 0).

Il genere *Larus* (n = 6 articoli) è risultato il più frequentemente testato per anticorpi anti-aMPV.

Sulla base del comportamento migratorio delle specie considerate, 10 sono state classificate come migratrici, 14 come residenti e 5 come migratrici/residenti.

Relativamente alle metodiche sierologiche impiegate, quattro studi hanno utilizzato test ELISA, sia con kit commerciali che con protocolli *in-house*, mentre due studi hanno impiegato test di neutralizzazione virale (VNT).

La *pooled seroprevalence* di aMPV negli uccelli selvatici è stata stimata al 14% (IC 95%: 1–39%) ($I^2 = 98\%$, $p < 0,01$; Figura 2). A causa della limitata disponibilità di dati, non è stato possibile condurre *sub-group analyses* sugli studi sierologici.

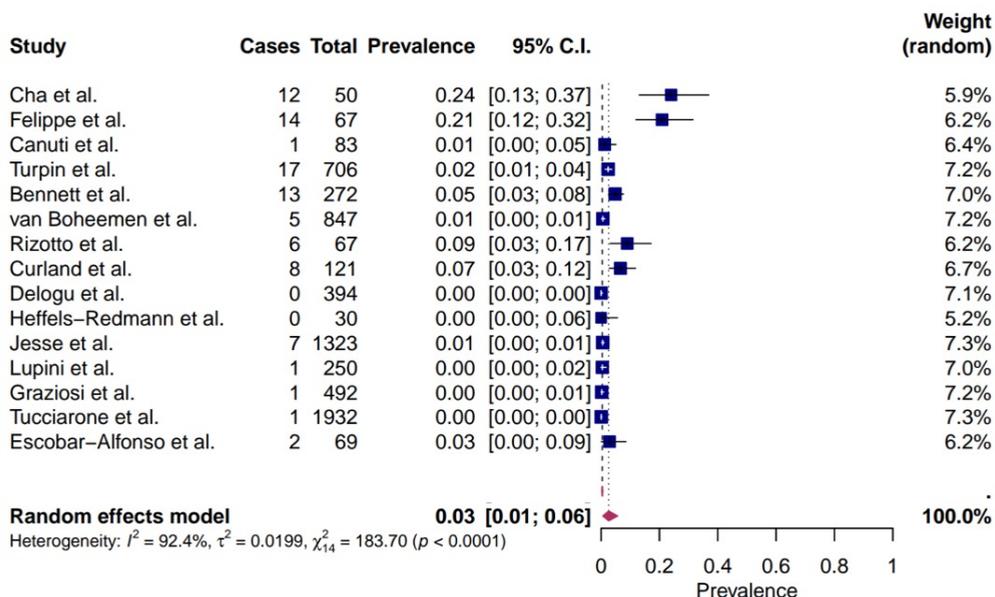


Figura 1. Forest plot della *pooled molecular prevalence* di aMPV in avifauna selvatica. I^2 (indice di inconsistenza), τ^2 = varianza tra gli studi, χ^2 and p -value del Cochran's Q test per l'eterogeneità.

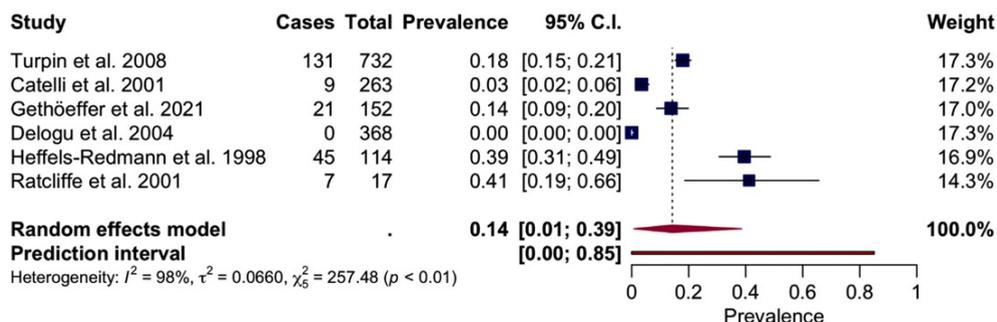


Figura 2. Forest plot *pooled seroprevalence* di aMPV in avifauna selvatica. I^2 (indice di inconsistenza), τ^2 = varianza tra gli studi, χ^2 and p -value del Cochran's Q test per l'eterogeneità.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ad oggi, il ruolo epidemiologico degli uccelli selvatici come *reservoir* o *carrier* di aMPV non è stato ancora completamente chiarito. Nel presente studio, una revisione sistematica della letteratura accompagnata da una meta-analisi dei dati disponibili è stata condotta con l'obiettivo di stimare la prevalenza di aMPV nell'avifauna selvatica. La prevalenza aggregata stimata è risultata pari al 3% per gli studi molecolari e al 14% per quelli sierologici, suggerendo un'esposizione moderata delle specie selvatiche al virus.

L'elevato grado di *between study heterogeneity* (I^2 : 92,4%–98%) suggerisce la presenza di variabili potenzialmente influenti sull'esito della positività molecolare o sierologica. Le *subgroup analyses* hanno infatti evidenziato un'associazione significativa tra la prevalenza molecolare e l'area di studio, mentre il comportamento migratorio delle specie testate non è risultato significativamente associato alla prevalenza. Tuttavia, non può essere esclusa la possibilità che le specie migratrici contribuiscano alla diffusione di aMPV lungo le principali rotte migratorie, in analogia con quanto osservato per il virus dell'influenza aviaria (Graziosi et al., 2022; Tucciarone et al., 2022; Franzo et al., 2024). Le specie residenti, invece, potrebbero agire da *bridge hosts* tra ambienti naturali ed allevamenti avicoli, considerata la loro frequente presenza nelle vicinanze dei capannoni (Martelli et al., 2023; Graziosi et al., 2024a; Graziosi et al., 2024b).

Complessivamente, le evidenze molecolari e sierologiche suggeriscono che alcuni *taxa* di uccelli selvatici potrebbero avere un ruolo nell'epidemiologia di aMPV. In particolare, sulla base dei contributi scientifici considerati, anatre selvatiche, oche, fagiani e gabbiani sembrano essere sensibili all'infezione da aMPV. Ulteriori indagini su queste specie potrebbero quindi contribuire a una migliore comprensione del loro ruolo nell'epidemiologia del virus. In tal senso, sarebbe auspicabile proseguire e ampliare le attività di monitoraggio dell'aMPV nelle popolazioni selvatiche, ponendo priorità alle specie più frequentemente osservate in prossimità degli allevamenti. Un approccio integrato, che combini metodiche diagnostiche dirette e indirette all'interno della stessa popolazione di studio, potrebbe risultare particolarmente utile, anche sfruttando attività di inanellamento condotte da ornitologi specializzati o da programmi di sorveglianza attiva per malattie soggette a notifica obbligatoria, come l'influenza aviaria. Infine, si raccomanda la raccolta sistematica di informazioni sugli individui campionati, quali sesso e classe d'età, al fine di poter delinearne con maggiore precisione la dinamica dell'infezione nelle popolazioni indagate.

BIBLIOGRAFIA

1. Bennett RS, Nezworski J, Velayudhan BT, Nagaraja KV, Zeman DH, Dyer N, Graham T, Lauer DC, Njenga MK and DA Halvorson. (2004). Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Dis.* 48: 902–908.
2. Cha RM, Yu Q and L Zsak. (2013). The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. *Virology* 45: 38.
3. Cook AJ. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 602–613.
4. Franzo G, Legnardi M, Faustini G, Baston R, Poletto F, Cecchinato M and CM Tucciarone. (2024). Tracing the flight: Investigating the introduction of avian metapneumovirus (aMPV) A and B. *Animals* 14: 1786.

5. Franzo G, Tucciarone CM, Enache M, Bejan V, Ramon G, Koutoulis KC and M Cecchinato. (2017). First report of avian metapneumovirus subtype B field strain in a Romanian broiler flock during an outbreak of respiratory disease. *Avian Dis.* 61: 250–254.
6. Graziosi G, Lupini C, Dalla Favera F, Martini G, Dosa G, Garavini G, Trevisani G, Mannelli A and E Catelli. (2024a). Potential biosecurity breaches in poultry farms: Presence of free-ranging mammals near laying-hen houses assessed through a camera-trap study. *Vet. Anim. Sci.* 26: 100393.
7. Graziosi G, Lupini C, Favera FD, Martini G, Dosa G, Trevisani G, Garavini G, Mannelli A and E Catelli. (2024b). Characterizing the domestic-wild bird interface through camera traps in an area at risk for avian influenza introduction in Northern Italy. *Poult. Sci.* 103: 103892.
8. Graziosi G, Mescolini G, Silveira F, Lupini C, Tucciarone CM, Franzo G, Cecchinato M, Legnardi M, Gobbo F, Terregino C and E Catelli. (2022). First detection of avian metapneumovirus subtype C Eurasian lineage in a Eurasian wigeon (*Mareca penelope*) wintering in Northeastern Italy: An additional hint on the role of migrating birds in the viral epidemiology. *Avian Pathol.* 51: 283–290.
9. Heffels-Redmann U, Neumann U, Braune S, Cook JKA and J Prüter. (1998). Serological evidence for susceptibility of sea gulls to avian pneumovirus (APV) infection. *Proc. Int. Symp. Infect. Bronchitis Pneumovirus Infect. Poult.*, 23–25.
10. Higgins JPT and SG Thompson. (2002). Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* 21: 1539–1558.
11. 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 (Basel)* 13.
12. 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.
13. Martelli L, Fornasiero D, Scarton F, Spada A, Scolamacchia F, Manca G and P Mulatti. (2023). Study of the interface between wild bird populations and poultry and their potential role in the spread of avian influenza. *Microorganisms* 11: 2601.
14. Mescolini G, Lupini C, Franzo G, Quaglia G, Legnardi M, Cecchinato M, Tucciarone CM, Blanco A, Turblin V, Biarnés M, Tatone F, Falchieri M and E Catelli. (2021). What is new on molecular characteristics of avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transbound. Emerg. Dis.* 68: 1314–1322.
15. Miller JJ. (1978). The inverse of the Freeman – Tukey double arcsine transformation. *Am. Stat.* 32(4): 138.
16. Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, Shekelle P, Stewart LA and PRISMA-P Group. (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst. Rev.* 4(1): 1.
17. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE and D Moher. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 372: 71.

18. R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
19. Rizotto LS, Simão RM, Scagion GP, Simasaki AA, Caserta LC, Benassi JC, Arns CW and HL Ferreira. (2019). Detection of avian metapneumovirus subtype A from wild birds in the State of São Paulo, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 39: 209–213.
20. Senne D, Edson JC and BP Pederson. (1997). Avian pneumovirus update. *Proc. 134th Annu. Conv. Am. Vet. Med. Assoc.*, Reno, Nevada, 190.
21. Sun S, Chen F, Cao S, Liu J, Lei W, Li G, Song Y, Lu J, Liu C, Qin J and H Li. (2014). Isolation and characterization of a subtype C avian metapneumovirus circulating in Muscovy ducks in China. *Vet. Res.* 45: 74.
22. Toquin D, Bâyon-Auboyer MH, Etteradossi N, Jestin V and H Morin. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet. Rec.* 145.
23. Tucciarone CM, Franzo G, Legnardi M, Pasotto D, Lupini C, Catelli E, Quaglia G, Graziosi G, Dal Molin E, Gobbo F and M Cecchinato. (2022). Molecular survey on A, B, C and new avian metapneumovirus (aMPV) subtypes in wild birds of Northern-Central Italy. *Vet. Sci.* 9.
24. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Alejo CT, Listorti V, Mescolini G, Brandão PE, Martini M, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Avian metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97: 503–509.
25. Turpin EA, Stallknecht DE, Slemons RD, Zsak L and DE Swayne. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathol.* 37: 343–351.
26. Wei L, Zhu S, Yan X, Wang J, Zhang C, Liu S, She R, Hu F, Quan R and J Liu. (2013). Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.* 19: 1092–1094.

DINAMICHE DI CIRCOLAZIONE ED EVOLUZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) IN UN ALLEVAMENTO DI SVEZZAMENTO

Legnardi M.¹, Sartore P.², Poletto F.¹, Franzo G.¹, Tucciarone C.M.¹, Cecchinato M.¹

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

² *Veterinario settore avicolo*

Summary

Despite rural poultry farms represent a small part of the overall Italian poultry production compared to intensive ones, some of their features, including lower biosecurity measures and frequent connections between different establishments, may provide a favorable setting for the persistence and transmission of viral infectious agents. The aim of the present study was to evaluate the circulation of infectious bronchitis virus (IBV), one of the most widespread poultry pathogens, within a multi-age, multi-species dealer farm located in the Veneto region.

Over the course of 5 months (January-May 2025), 10 rhinopharyngeal swabs were collected every 10 days from each group present in the farm. This longitudinal approach resulted in the collection of 130 pooled respiratory samples from 32 groups of chickens, 4 of guinea fowls, 3 of quails, 3 of ducks and a single group of pheasants. All samples were subjected to two RT-PCRs for IBV detection, one generic and another specific for genogroup GVIII. Sequences obtained from positive samples were then used for phylogenetic and recombination analyses.

Fifty-eight out of 90 samples (64,4%) collected from 23 chicken groups (71,9%) tested positive for IBV, which was not found in other species. Both vaccine and field strains were detected, representing five lineages (GI-1, GI-13, GI-16, GI-19, GVIII-2) plus two potential recombinants. Multiple groups were positive to different strains at different time points, with several intermittent detections and coinfections involving GVIII-2 together with other lineages belonging to GI.

Based on these findings, rural dealer farms seem to potentially contribute to the spread and maintenance of IBV and likewise of other viral pathogens. Although reports of clinical outbreaks or increased mortality were very limited according to the farm owner, such an uncontrolled and prolonged circulation of multiple strains may favor the emergence and selection of novel variants, thus requiring increased surveillance and control efforts.

INTRODUZIONE

Sostenuta da continui avanzamenti tecnologici e crescenti livelli di integrazione, l'industria avicola rappresenta uno dei principali settori zootecnici a livello globale. Sebbene la sua costante crescita sia sostenuta perlopiù dai sistemi intensivi, gli allevamenti rurali rappresentano una nicchia produttiva non trascurabile anche nei Paesi sviluppati. Essa è caratterizzata da una elevata eterogeneità, raggruppando tipologie di allevamento con finalità e caratteristiche diverse (es. commercianti, produttori per autoconsumo, hobbisti,...), spesso caratterizzati da livelli di biosicurezza e capacità diagnostiche e di controllo non comparabili con quelli delle

aziende intensive (Gentile et al., 2024). Il ruolo degli allevamenti rurali nell'epidemiologia delle malattie infettive è quindi potenzialmente rilevante, ma spesso trascurato o non adeguatamente rilevato dai sistemi di monitoraggio messi in atto. L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare, attraverso un'indagine longitudinale condotta con un approccio di biologia molecolare, la circolazione e l'evoluzione del virus della bronchite infettiva (IBV) in un allevamento di svezamento, definito legislativamente come uno stabilimento in cui i volatili sono allevati per una parte del ciclo produttivo per poi essere venduti prevalentemente all'interno del circuito rurale (es. a commercianti o ad allevamenti familiari) (D. M. 25/06/10).

IBV è un patogeno responsabile di sindromi respiratorie, renali e riproduttive nei polli di tutte le età e categorie produttive. Trattandosi di un gammacoronavirus, esso presenta un'elevata propensione alla mutazione e alla ricombinazione, che esitano nella compresenza e nella continua comparsa di nuovi sottotipi genetici, spesso caratterizzati da differenze in termini di antigenicità, patogenicità e tropismo tissutale (Legnardi et al., 2020). La sua endemicità, che obbliga al ricorso routinario alla vaccinazione secondo protocolli spesso complessi, lo rende un modello ideale da studiare per definire le modalità di trasmissione e persistenza anche di altri virus aviari.

MATERIALI E METODI

L'azienda oggetto dello studio si trovava in Veneto e presentava un'organizzazione multi-specie e multi-età. Le specie allevate includevano polli (broiler e ovaiole), quaglie, anatre, fagiani e faraone. I broiler, le faraone e i fagiani provenivano direttamente dagli incubatoi, mentre le anatre potevano provenire anche da altri rivenditori, ma erano comunque introdotte nella prima settimana di vita. A seconda della domanda, i broiler erano talvolta acquistati anche in età più avanzata. Questi animali venivano allevati per periodi di tempo variabili, fino alla vendita a clienti privati o altri rivenditori. Le ovaiole e le quaglie erano invece acquistate principalmente per essere rivendute nell'arco di pochi giorni. Nell'allevamento oggetto di studio non veniva condotta alcuna vaccinazione nei confronti di IBV, sebbene i polli fossero immunizzati prima dell'arrivo in azienda.

L'allevamento era strutturato in due siti separati (denominati A e B), distanti circa 1 km. Il sito A comprendeva un capannone con sei stanze separate per i polli, recinti esterni per le anatre, il punto vendita e un macello aziendale. Il sito B era composto da due capannoni per i polli, uno con otto stanze e l'altro con cinque stanze con accesso esterno. Erano inoltre presenti recinti esterni per fagiani e faraone. Pulizia e disinfezione venivano effettuate ogni volta che un gruppo lasciava l'allevamento, mentre un periodo di "tutto pieno-tutto vuoto" della durata di circa 15 giorni veniva osservato una volta all'anno in ciascun sito con tempistiche differenti.

Lo studio ha avuto una durata di circa 5 mesi, da inizio gennaio 2024 a fine maggio 2024. Durante questo periodo è stato svolto un campionamento longitudinale a intervalli di circa 10 giorni, prelevando 10 tamponi rinofaringei da ciascun gruppo di animali presente in allevamento ad ogni momento di campionamento. Tali prelievi venivano effettuati anche ad ogni entrata o uscita di un gruppo che avvenisse in giorni non coincidenti con i punti di campionamento stabiliti. I tamponi di ciascun gruppo sono stati processati in *pool*, ognuno etichettato con un codice a due lettere

corrispondente alla specie, seguito da due numeri progressivi che segnalavano il gruppo e il punto di campionamento, più una eventuale lettera progressiva finale per i sottogruppi creati spostando animali in recinti diversi.

Dopo l'estrazione degli acidi nucleici, ogni campione è stato testato con due RT-PCR disegnate sul gene S1 di IBV e scelte considerando informazioni disponibili sull'epidemiologia di IBV in Italia. Uno dei due test, in cui venivano usati i primer XCE1+ e XCE2- (Cavanagh et al., 1999), era disegnato per l'amplificazione generica di IBV, mentre il secondo, basato sui primer IB80-672F e IB80-1349R (Legnardi et al., 2024), era specifico per il genotipo GVIII.

I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger con entrambi i primer utilizzati nella rispettiva RT-PCR. I cromatogrammi sono stati poi ispezionati e rifiniti con FinchTV (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA) e le sequenze consenso sono state generate con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Australia). Dopo aver allineato le sequenze con metodo MUSCLE, le analisi filogenetiche sono state condotte con MEGA X (Kumar et al., 2018) utilizzando l'approccio di *Maximum Likelihood* con 1000 replicati e applicando il modello di sostituzione con il valore più basso in termini di *Bayesian Information Criterion* (BIC). Le analisi di ricombinazione sono state eseguite con RDP4 (Martin et al., 2015), considerando solo eventi identificati da almeno tre metodi con $p < 0,05$.

RISULTATI

Durante lo studio sono stati raccolti 130 campioni da 43 gruppi (32 di polli, 4 di faraone, 3 di quaglie, 3 di anatre e 1 di fagiani). IBV è stato rilevato in 23 gruppi di polli (71,9%) ma non in altre specie. In particolare, 58 dei 90 campioni di polli (64,4%) sono risultati positivi alla RT-PCR generica e 11 (12,2%) al test GVII-I-specifico. Le analisi filogenetiche hanno identificato 7 ceppi GI-1 (Mass), 21 GI-13 (793/B), 1 GI-16 (Q1), 29 GI-19 (QX) e 11 GVIII-2 (IB80) (Figura 1).

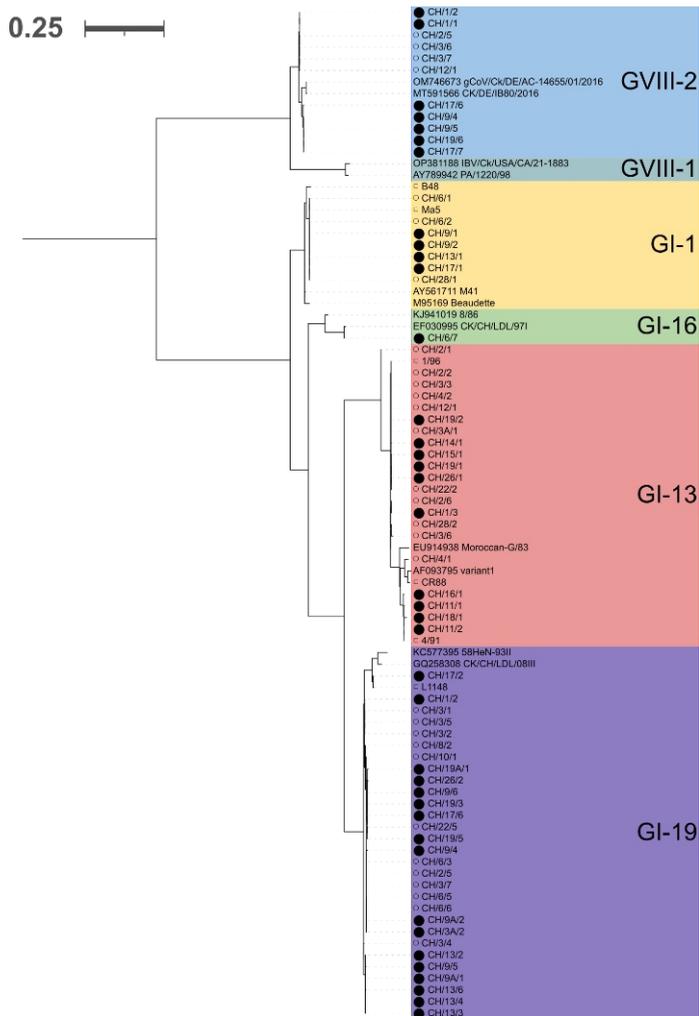


Figura 1. Albero filogenetico contenente i ceppi IBV identificati, contrassegnati da un cerchio nero (●) o bianco (○) a seconda che fossero stati ritrovati nel sito A o B. L'albero include inoltre delle referenze vaccinali, etichettate con un quadrato bianco (□), ed è stato generato usando il modello di sostituzione T92+G+I (Tamura, 1992).

Tutti i ceppi Mass si sono dimostrati geneticamente simili al ceppo vaccinale Ma5, mentre 15 e 4 tra i ceppi 793/B erano rispettivamente identici o simili ai ceppi vaccinali 1/96 e 4/91. Due ceppi 793/B sono risultati essere potenziali ricombinanti: uno aveva come possibili progenitori due ceppi vaccinali 793/B, in particolare 1/96 e CR88, mentre l'altro sembrava originato da una ricombinazione che coinvolgeva 1/96 e QX. L'unico ceppo Q1 ritrovato era un virus di campo, così come tutti i ceppi QX ad eccezione di un singolo virus, la cui sequenza mostrava un'identità del 99,8% con la referenza vaccinale L1148.

In numerosi gruppi sono stati rilevati più lineage di IBV in momenti di campionamento differenti, talvolta con negatività intermittenti. In 8 casi l'utilizzo di due diversi saggi di RT-PCR ha permesso di rilevare delle coinfezioni, in 6 casi tra ceppi IB80 e QX e 2 volte tra IB80 e 1/96 (Figura 2).

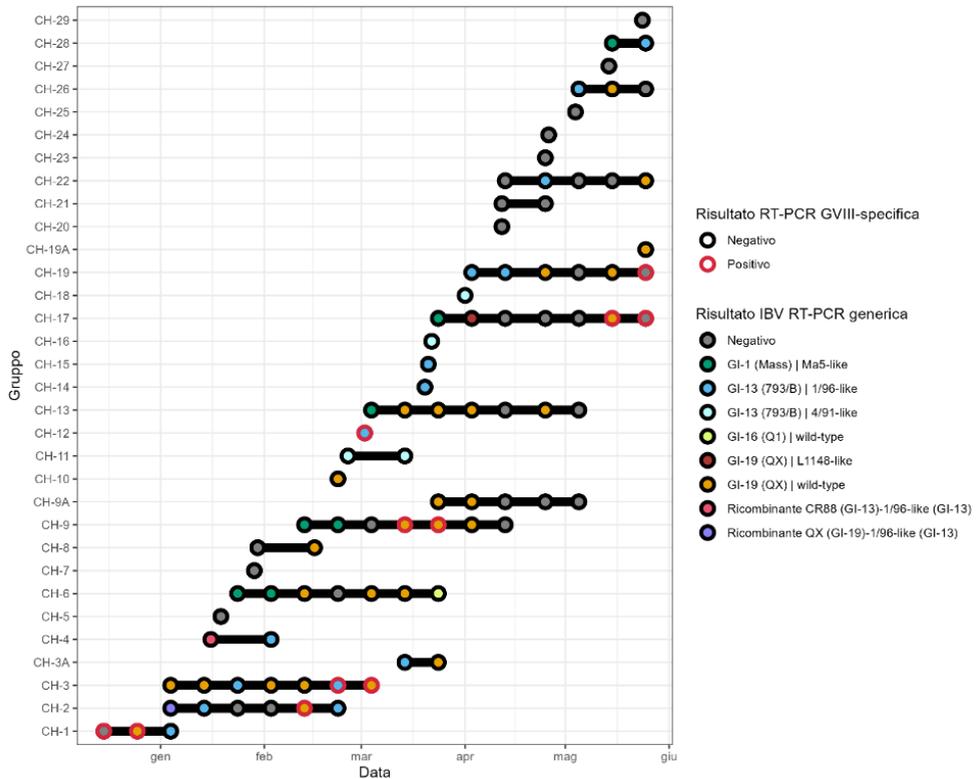


Figura 2. Successione temporale delle positività per IBV nei diversi gruppi di polli campionati durante lo studio longitudinale. I risultati del saggio di RT-PCR generico sono indicati dal colore interno di ciascun cerchio, mentre quelli del test GVIII-specifico dal colore del contorno.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno dimostrato un'importante circolazione virale nell'allevamento oggetto di studio, quantomeno nei gruppi di polli, mentre nessuna positività è stata riscontrata nelle altre specie, coerentemente con il tropismo di IBV. I numerosi ritrovamenti si sono dimostrati ascrivibili sia a ceppi vaccinali (Mass, 793/B o QX) che di campo. Il fatto che questi ultimi fossero prevalentemente ceppi QX conferma la predominanza di tale lineage in Italia (Franzo et al., 2020), mentre più sorprendente è la singola identificazione di Q1, in passato molto rilevante (Toffan et al., 2011) ma oggi raramente identificato in Italia. I restanti stipiti di campo appartenevano a GVIII-2 ed erano geneticamente affini a IB80: la prima segnalazione di questi ceppi a livello nazionale è avvenuta solo di recente (Legnardi et al., 2024) e solo

a seguito dell'adozione del saggio specifico usato nel presente studio, necessario per via dell'elevata divergenza di GVIII dai ceppi comunemente circolanti e quindi ricercati. Il dato più rilevante in merito a questo lineage è sicuramente la sua identificazione non solo in gruppi di ovaiole, ma anche in polli di carne. La maggioranza delle identificazioni di IB80 sono state infatti riportate in animali a lunga vita, in cui sembra associato a problematiche riproduttive (Petzoldt et al., 2022; Legnardi et al., 2024). Si può ipotizzare che tale rilievo possa essere stato favorito dall'allevamento di ovaiole e broiler all'interno dello stesso allevamento, un'evenienza tipicamente incontrata in sistemi di allevamento rurali. Due ceppi sono stati individuati come potenziali ricombinanti. In un caso la ricombinazione sembra aver coinvolto un ceppo di campo QX ed il virus vaccinale 1/96, entrambi ritrovati nel medesimo gruppo in altri momenti di campionamento; i progenitori del secondo ricombinante sembravano invece essere un ceppo vaccinale effettivamente somministrato (1/96) e un altro non ritrovato in alcun campione prelevato durante lo studio (CR88). Quest'ultimo evento di ricombinazione potrebbe quindi aver avuto luogo fuori dall'allevamento, anche se non si può escludere che la presenza di CR88 possa non essere stata rilevata dalle analisi molecolari.

Dal punto di vista della circolazione virale, non è emersa alcuna separazione tra i due siti aziendali in termini di ceppi circolanti, suggerendo che le misure di biosicurezza adottate non fossero sufficienti a prevenire la diffusione da sito a sito, anche per via dei frequenti spostamenti di animali all'interno dell'azienda. Tuttavia, il numero di rilevamenti di ceppi di campo sembra essere diminuito dopo il periodo di "tutto pieno-tutto vuoto" osservato nel sito B durante il periodo di campionamento (14 marzo-3 aprile 2024), indicando un'efficacia almeno parziale della misura.

Le identificazioni di ceppi vaccinali, specialmente per quanto riguarda Mass, si sono verificate tendenzialmente nei primi punti di campionamento, in accordo con la loro cinetica (Tucciarone et al., 2018), mentre quelle di virus di campo sono state più distribuite. Numerose sono state le positività intermittenti, così come i ritrovamenti di diversi ceppi all'interno dello stesso gruppo. È verosimile pensare che tale eterogeneità sia stata addirittura sottostimata: il ricorso a due soli saggi di RT-PCR, di cui uno generico, consentiva infatti l'identificazione al massimo di due ceppi contemporaneamente anche qualora ne fossero presenti in numero maggiore.

Nonostante la costante presenza di virus di campo all'interno dell'allevamento, l'allevatore non ha riportato particolari episodi clinici o aumenti di mortalità durante il periodo di studio. L'impatto di IBV potrebbe essere stato mitigato dall'utilizzo di razze a lenta crescita, dalle basse densità di allevamento e dall'efficacia dei vaccini somministrati prima dell'acquisto degli animali. Tuttavia, va sottolineato come la circolazione incontrollata di IBV, anche qualora non causi direttamente sintomatologia, possa favorire sul lungo termine l'emergenza e la selezione di nuove varianti.

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio dimostrano che il settore rurale e in particolare gli allevamenti di svezzamento possono giocare un ruolo significativo nella circolazione e nell'evoluzione di IBV così come di altri patogeni virali. Alla luce delle numerose interconnessioni con altri attori del settore avicolo, ciò può rappresentare una vulnerabilità per l'intero sistema produttivo, richiedendo un rafforzamento delle attività di monitoraggio e delle misure di controllo.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and CJ Naylor. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28: 593–605.
2. Decreto Ministeriale 25/06/10. Accessibile presso <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2010/08/23/10A10245/sg>.
3. 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). Phylogenetic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. *Sci. Rep.* 10: 7289.
4. Gentile N, Carrasquer F, Marco-Fuertes A and C Marin C. (2024). Backyard poultry: exploring non-intensive production systems. *Poult. Sci.* 103: 103284;
5. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
6. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G and M Cecchinato. (2020). Infectious bronchitis virus evolution, diagnosis and control. *Vet. Sci.* 7: 79.
7. Legnardi M, Poletto F, Franzo G, Harper V, Bianco L, Andolfatto C, Blanco A, Biarnés M, Ramon L, Cecchinato M and CM Tucciarone. (2024). Validation of an infectious bronchitis virus GVIII-specific RT-PCR assay and first detection of IB80-like strains (lineage GVIII-2) in Italy. *Front. Vet. Sci.* 11: 1514760.
8. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A and B Muhire. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1: vev003.
9. Petzoldt D, Vogel N, Bielenberg W, Haneke J, Bischoff H, Liman M, Rönchen S, Behr K-P and T Menke. (2022). IB80—a novel infectious bronchitis virus genotype (GVIII). *Avian Dis.* 66: 291-298.
10. Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687.
11. Toffan A, Terregino C, Mazzacan E, Castaldello I, Capua I and M Bonci. (2011). Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet. Rec.* 169: 212–213.
12. Tucciarone CM, Franzo G, Berto G, Drigo M, Ramon G, Koutoulis KC, Catelli E and M Cecchinato. (2017). Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. *Poult. Sci.* 97: 303-312.

BURSITE INFETTIVA AVIARE IN KENYA: CIRCOLAZIONE DI CEPI VERY VIRULENT IN BROILER VACCINATI

Lizzi G.¹, Quaglia G.¹, Legnardi M.², Catelli E.¹, Graziosi G.¹, Tomasoni R.¹, Napolitano M.³, Messo W.⁴, Lupini C.¹

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

² *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro (PD), 35020, Italia;*

³ *Hybrid Poultry Farm (Z) Ltd, Chamba Valley, Chelstone. P.O. BOX 310097, Lusaka, Zambia;*

⁴ *Kenchic, Exsan Hse, Enterprise Rd, P.O. BOX 20052, 00200 Nairobi, Kenya.*

Summary

Infectious Bursal Disease (IBD), caused by the infectious bursal disease virus (IBDV), continues to pose a major challenge to poultry production globally, leading to significant economic losses. Between 2022 and 2024, bursal samples were collected from 44 suspected IBD outbreaks in broiler flocks across six Kenyan counties, involving birds aged 19 to 31 days, all previously vaccinated with an immune complex vaccine. Bursal imprints on QIAcard FTA™ Classic cards were submitted for RT-PCR testing targeting the VP2 gene (segment A) for IBDV detection. Positive samples underwent further analysis, including amplification of the VP1 gene (segment B), sequencing, and phylogenetic assessment of both genome segments. IBDV was detected in 24 out of 44 samples. Of these, 23 strains were classified as genotype A3B2 (very virulent IBDV, vvIBDV), closely related to strains circulating in Sub-Saharan Africa. One strain matched the vaccine strain used. Amino acid sequence analysis of the vvIBDV strains revealed the presence of known virulence markers in segment A (A222, I242, Q253, I256, D279, I294, S299, and the serine-rich heptapeptide SWSASGS at positions 326–332) and in segment B (TDN motif at positions 145–147). To our knowledge, this is the first report describing the molecular features of field IBDV strains affecting broilers in Kenya, enhancing the understanding of IBDV epidemiology in Africa. The results underline the necessity for ongoing surveillance, strengthened biosecurity, and improved vaccination strategies.

INTRODUZIONE

La bursite infettiva aviare (IBD), conosciuta anche come malattia di Gumboro, è una malattia immunosoppressiva del pollo ad eziologia virale, altamente contagiosa, che provoca ingenti perdite economiche nel settore avicolo (Etteradossi & Saif, 2020). Il virus della bursite infettiva aviare (IBDV), appartiene alla specie *Avibirnavirus gumboroense*, genere *Avibirnavirus*, famiglia *Birnaviridae* (Delmas et al., 2018) e colpisce in particolare animali tra le 2 e le 6 settimane di vita. IBDV presenta simmetria icosaedrica, è privo di envelope e ha un diametro variabile tra 55 e 65 nm (Etteradossi & Saif, 2020). Il genoma è costituito da due segmenti lineari di RNA a doppio filamento, codificanti, il segmento A, per quattro proteine virali (VP2-VP5) e, il segmento B, per la VP1 (RNA polimerasi RNA-dipendente)

(Delmas et al., 2018).

Storicamente i ceppi sono stati classificati basandosi su patogenicità e antigenicità in classici, varianti, e very virulent.

Attualmente, la classificazione si basa sull'analisi filogenetica delle sequenze genetiche della VP2 del segmento A e della VP1 del segmento B, secondo il sistema proposto da Islam et al. (2021). Questo approccio ha permesso di identificare dieci genogruppi per la VP2 (da A0 ad A9) e cinque genogruppi per la VP1 (da B1 a B5), la cui combinazione consente una classificazione in diversi genotipi (ad esempio, A1B1, A2B1, ecc.) (Legnardi et al., 2022).

In Africa, dove l'avicoltura riveste un ruolo fondamentale per l'economia, IBDV rappresenta una problematica rilevante sia per l'allevamento industriale sia per quello rurale. L'obiettivo di questo studio è stato quello di caratterizzare da un punto di vista molecolare ceppi di IBDV circolanti in Kenia in allevamenti di broiler, utilizzando l'attuale schema di classificazione filogenetica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Tra gennaio 2022 e agosto 2024 sono stati inviati a scopo diagnostico presso il Servizio di Patologia Aviare del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna (Ozzano dell'Emilia, Italia) 44 campioni di borse di fabrizio su FTA cards provenienti da allevamenti di broiler localizzati in sei contee del Kenya: 12 da Kajiado, 10 da Kiambu, 9 da Machakos, 7 da Muranga, 5 da Nairobi e 1 da Nakuru. L'età degli animali al momento del campionamento variava da 19 a 31 giorni. Tutti i gruppi campionati erano stati vaccinati con un vaccino ad immunocomplessi (ICX).

Processazione dei campioni ed estrazione dell'RNA virale

Frammenti di circa 4 mm² di campione sono stati ritagliati dalle FTA cards ed eluiti in 500 µl di soluzione sterile di fosfato tamponato (PBS 1X, pH 7,4). L'eluato è stato lasciato a +4 °C per un'ora e agitato occasionalmente con vortex. Per l'estrazione dell'RNA sono stati utilizzati 200 µl ed utilizzato il kit commerciale NucleoSpin® RNA Plus Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germania), seguendo le istruzioni del produttore. L'RNA estratto è stato conservato a -80 °C fino alle successive analisi.

Analisi molecolari e sequenziamento

L'RNA estratto è stato analizzato mediante un protocollo di RT-PCR descritto da Jackwood e Sommer-Wagner (2005), finalizzato all'amplificazione di un frammento di 743 pb del gene VP2. I campioni risultati positivi sono stati successivamente sottoposti a un secondo protocollo di RT-PCR, secondo quanto riportato da Islam et al., (2011), per amplificare un segmento di 1051 pb del gene VP1. I prodotti amplificati sono stati purificati utilizzando l'enzima ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, MA, USA) e infine sequenziati presso MacroGen Europe (Milano, Italia).

Analisi di sequenza e filogenetica

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state identificate mediante il tool di omo-

logia BLAST (Johnson et al., 2008), disponibile sul portale NCBI (National Center for Biotechnology Information), e suddivise in due dataset distinti: uno relativo al gene VP1 e l'altro al gene VP2. Successivamente, le sequenze 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 con sequenze omologhe presenti nel database GenBank®, *utilizzate da Islam et al.*, (2021) per la classificazione in genogruppi, tramite il software Clustal W (Thompson et al., 1994).

L'analisi filogenetica è stata infine eseguita utilizzando l'algoritmo Maximum Likelihood implementato nel software MEGA X (Kumar et al., 2018). I valori di bootstrap, calcolati su 1000 replicati, sono stati considerati significativi quando pari o superiori a 70 (Hillis e Bull, 1993).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 44 campioni analizzati, 24 (54,5%) sono risultati positivi per IBDV. Le analisi di sequenza e filogenetica hanno permesso di classificare 23 ceppi come appartenenti al genotipo A3B2 (very virulent secondo la classificazione tradizionale) e un ceppo come A1B1, con un'identità del 100% in entrambi i segmenti con il ceppo vaccinale Winterfield 2512 (Figure 1 e 2).

L'albero filogenetico mostra che i ceppi rilevati formano un cluster con isolati provenienti dall'Africa orientale, in particolare da Etiopia, Sudan e Zambia. Questo raggruppamento, geneticamente omogeneo e geograficamente localizzato, suggerisce una possibile trasmissione del virus attraverso rotte commerciali transfrontaliere.

L'analisi delle sequenze amminoacidiche dei 23 ceppi A3B2, confrontate con quelle di ceppi di riferimento vvIBDV, ha permesso di individuare marker amminoacidici associati alla virulenza (Brown et al., 1994; van den Berg et al., 2004; Jackwood et al., 2011; Yamaguchi et al., 1997) quali, a livello della proteina VP2, gli aminoacidi A222, I242, Q253, I256, D279, I294, S299 e la sequenza eptapeptidica ricca in serina SWSASGS (posizione 326–332) e, a livello della proteina VP1, gli aminoacidi T145 e A287.

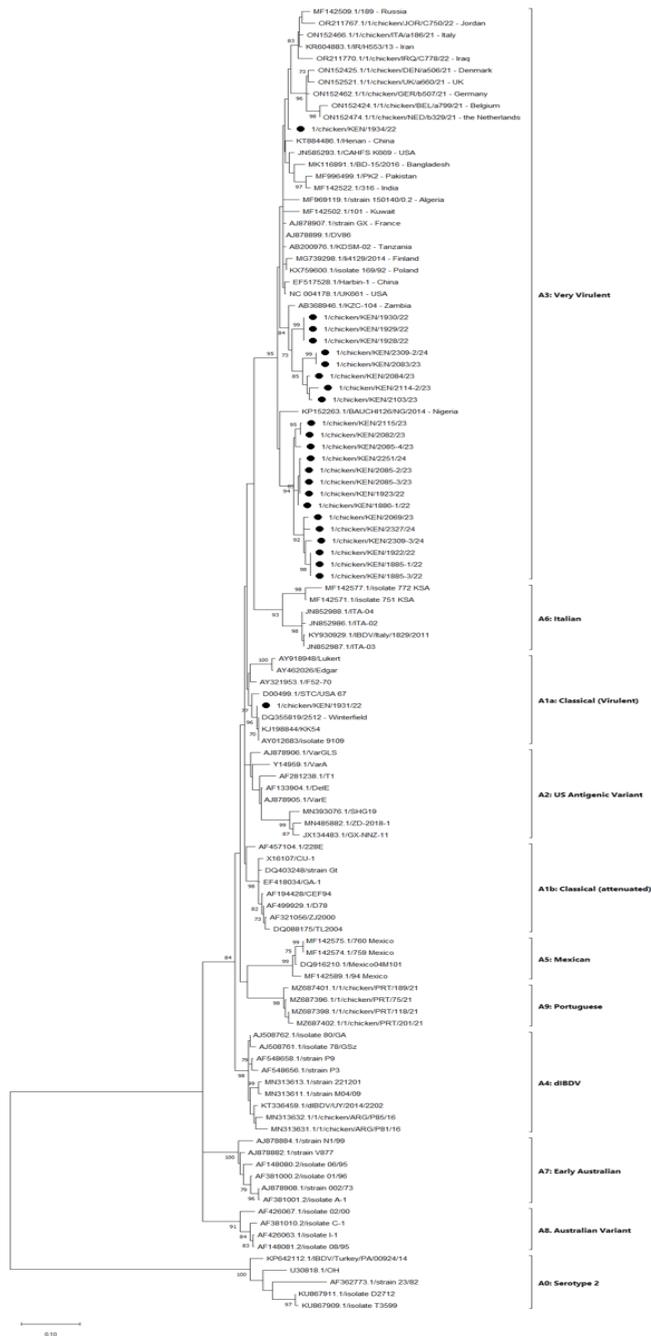


Figura 1: Albero filogenetico basato su una regione di 696 pb della VP2 del segmento A (nt. 769-1465) ottenuto utilizzando 87 ceppi di riferimento (numeri di accesso indicati nell'albero) e i 24 ceppi ottenuti nel presente studio (contrassegnati con un punto). Sono riportati solo i valori di bootstrap pari o superiori a 70.

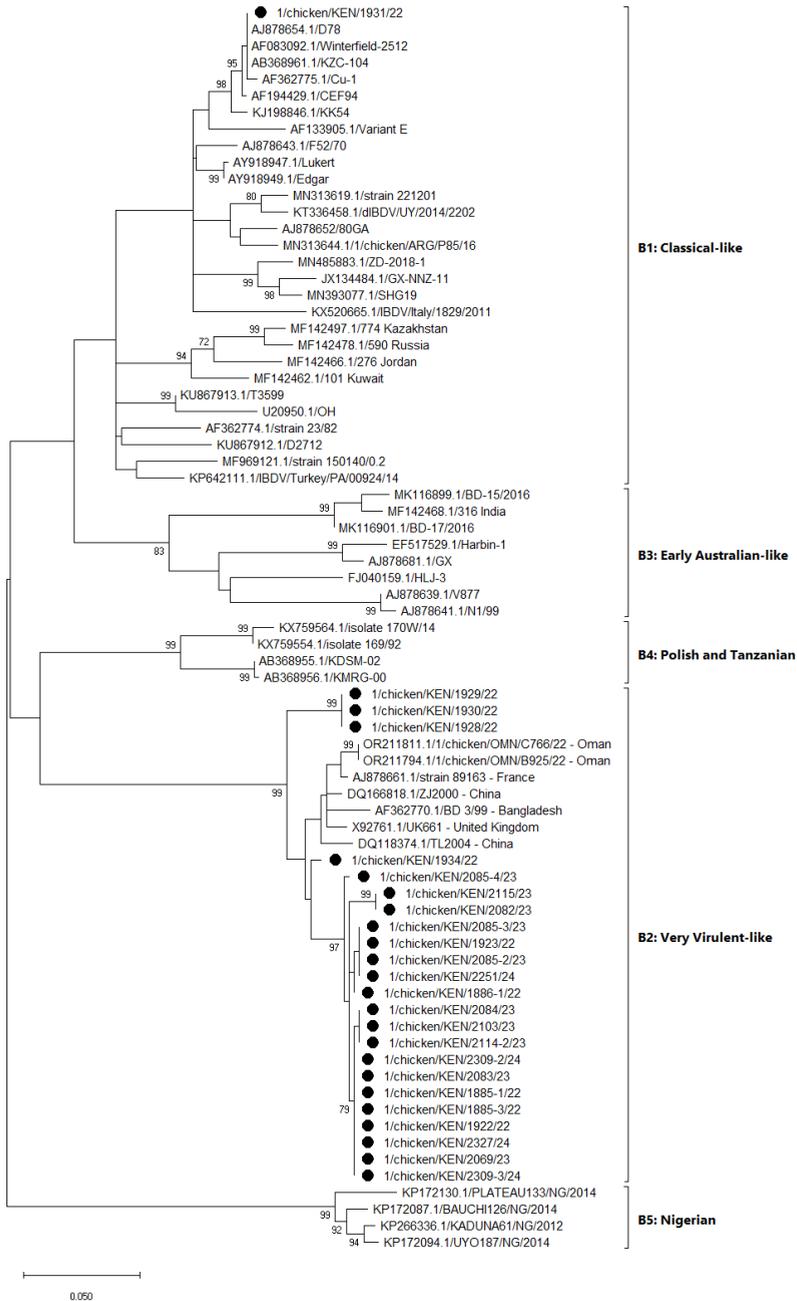


Figura 2: Albero filogenetico basato su una regione di 984 pb del gene VP1 del segmento B (nt. 370-1353), ottenuto utilizzando 51 ceppi di riferimento (numeri di accesso indicati nell'albero) e i 24 ceppi ottenuti nel presente studio (contrassegnati con un punto). Sono riportati solo i valori di bootstrap pari o superiori a 70.

CONCLUSIONI

Lo studio riporta la circolazione di ceppi very virulent di IBDV (genotipo A3B2) in allevamenti di broiler vaccinati in Kenya, evidenziando criticità nella protezione offerta dai piani vaccinali utilizzati o dalla loro applicazione. Questi risultati sottolineano l'urgenza di rafforzare le misure di biosicurezza e di monitorare l'efficacia dei piani vaccinali. Considerata la possibilità per IBDV di riassortimenti genetici e l'emergere di nuovi genotipi, è essenziale proseguire con studi mirati alla caratterizzazione molecolare dei ceppi circolanti per attuare piani profilattici adeguati alla situazione epidemiologica locale.

BIBLIOGRAFIA

1. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA and VN Vakharia. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 75: 11974–11982.
2. Brown MD, Green P and MA Skinner. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol.* 75: 675–680.
3. Delmas B, Attoui H, Ghosh S, Malik YS, Mundt E and VN Vakharia. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Birnaviridae, *J Gen Virol.* 100: 5–6.
4. Escaffre O, Le Nouën C, Amelot M, Ambroggio X, Ogden KM, Guionie O, Toquin D, Müller H, Islam MR and N Eterradossi. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol.* 87: 2767–2780.
5. Eterradossi N and YM Saif. (2020). Infectious bursal disease. In: *Diseases of Poultry*, 14th edn. Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, pp. 257–283.
6. Hillis DM and JJ Bull. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol.* 42: 182–192.
7. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Eterradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathol.* 50: 190–206.
8. Islam MR, Rahman S, Noor M, Chowdhury EH and H Müller. (2011). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Arch Virol.* 157: 333–336.
9. 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 Dis.* 49: 220–226.
10. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology*, 409: 33–37.
11. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S and TL Maden. (2008). NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Res.* 36(Web Server issue), W5–W9.
12. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol*

- Evol.* 35: 1547–1549.
13. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Duarte I, Silva M, Le Tallec B and M Cecchinato. (2022). Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathol.* 51: 97-105.
 14. Thompson JD, Higgins DG and TJ Gibson. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
 15. van den Berg TP, Morales D, Eterradossi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, Zierenberg K, Zhang MF, Zhu YP, Wang CQ, Zheng HJ, Wang X, Chen GC, Lim BL and H Müller. (2004). Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol.* 33: 470-476.
 16. Yamaguchi T, Ogawa M, Miyoshi M, Inoshima Y, Fukushi H and K Hirai. (1997). Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 142: 1441-1458.

VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI PROTEICHE DEL VIRUS DELL'INFLUENZA AVIARIA QUALE STRATEGIA DI PREVISIONE DEL RISCHIO ZOOTICO E SCENARI FUTURI

Mellace M.¹, Ceniti C.², Cataldi M.², Borrelli L.³, Tilocca B.⁴

¹*Dipartimento di Scienze della Salute, Università Magna Graecia di Catanzaro, 88100, Catanzaro, Italia;*

²*Dipartimento di Sanità Pubblica, ASL Napoli3 Sud, Corso Alcide De Gasperi, Castellammare di Stabia, Italia;*

³*Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Via Delpino n.1, 80137, Napoli, Italia;*

⁴*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Via Vienna n.2, 07100 Sassari (SS), Italia.*

Summary

Avian influenza virus poses an emerging public health risk due to its ability to broaden the host spectrum, including humans. The aim of this study was to investigate the evolutionary dynamics and the molecular mechanisms putatively responsible for infections spillovers. A bioinformatics approach on viral sequences is employed onto eight viral proteins involved in the process of adaptation to new hosts. Here, 156 amino acid mutations potentially associated with interspecies transmission were analysed with the BLASTP tool and compared through phylogenetic analysis. The results show significant evolutionary proximity between human and animal viral strains, and the identification of shared mutations suggests the presence of conserved mechanisms in spillover. The identification of hosts that share mutations with human strains highlights the potential role of these animals as reservoirs or vectors. Altogether, evidences from this study contribute to the understanding of viral adaptation and provides a blueprint for targeted preventive strategies, including molecular surveillance and the development of containment and prevention measures.

INTRODUZIONE

I virus dell'influenza aviaria (AIV) di tipo A rappresentano una minaccia persistente per la salute pubblica e veterinaria a causa della loro straordinaria plasticità genetica e della capacità di infettare un ampio spettro di ospiti, che vanno dagli uccelli selvatici ai mammiferi terrestri e marini, compreso l'uomo (Tilocca et al., 2024). Questi virus, caratterizzati da un genoma segmentato con RNA a singolo filamento e polarità negativa, sono noti per la loro capacità di evolvere rapidamente attraverso meccanismi di deriva e spostamento antigenico, favorendo l'emergere di nuove varianti potenzialmente pandemiche (AbuBakar et al., 2023). Sebbene gli uccelli acquatici selvatici siano considerati il principale serbatoio naturale di AIV, la crescente evidenza di spillover a specie domestiche e sinantropiche, come polli, maiali, gatti e visoni, richiede un'attenta rivalutazione del concetto di "mixing vessel" nell'epidemiologia dell'influenza. L'integrazione di osservazioni cliniche, epidemiologiche e molecolari suggerisce che la capacità adattativa interspecifica dell'AIV è regolata da precisi determinanti virali, tra cui mutazioni specifiche nel-

le proteine della polimerasi, nelle nucleoproteine e nelle glicoproteine di superficie. Sebbene la letteratura abbia descritto in modo frammentario alcune mutazioni associate allo spillover, mancano ancora modelli sistematici che colleghino tali alterazioni molecolari all'adattamento evolutivo negli ospiti mammiferi e all'efficienza replicativa nelle cellule umane. Questo studio mira a questa lacuna e, attraverso l'analisi bioinformatica e filogenetica avanzata, identifica le mutazioni amminoacidiche condivise tra ceppi animali e umani valutandone il potenziale impatto sul tropismo virale e sull'evoluzione adattativa.

MATERIALI E METODI

Identificazione di proteine e mutazioni potenzialmente coinvolte nello spillover

La revisione sistematica della letteratura scientifica degli ultimi dieci anni ha permesso di selezionare le proteine del virus dell'influenza aviaria di tipo A coinvolte nel fenomeno dello spillover di specie, con particolare attenzione alle mutazioni che favoriscono l'adattamento a diversi ospiti o la trasmissione intraspecifica da uomo a uomo.

La ricerca bibliografica è stata effettuata sui database pubblici PubMed e Google Scholar, utilizzando le parole chiave: "avian influenza", "Proteins", "Mutations" e "Spillover", e selezionando articoli che riportavano evidenze sperimentali o eventi correlati a mutazioni chiave per lo switching interspecie. Le mutazioni considerate riguardano le principali proteine virali, sia strutturali che non strutturali, che svolgono un ruolo fondamentale nella struttura e nel ciclo infettivo del virus, inclusa la capacità di eludere il sistema immunitario o facilitare la trasmissione tra specie di interesse zoonotico. Le sequenze proteiche selezionate sono state scaricate dal database NCBI Virus, in maniera ristretta ad ospiti specifici quali *Homo sapiens* (uomo), *Gallus gallus* (pollo), *Canis lupus familiaris* (cane), *Felis catus* (gatto), *Sus scrofa* (maiale), *Meleagris gallopavo* (tacchino), *Cygnus cygnus* (cigno), *Anser anser* (oca), *Larus argentatus* (gabbiano) e *Anas platyrhynchos domesticus* (anatra).

I criteri di inclusione delle sequenze considerano la distribuzione geografica, la completezza e la lunghezza della sequenza. Questo approccio ha permesso di costruire un dataset *ad hoc* multi-ospite, utile per consentire l'analisi comparativa delle sequenze e per identificare le mutazioni associate all'adattamento interspecie.

Allineamento di sequenze proteiche umane e analisi filogenetica

Le sequenze proteiche sono state allineate utilizzando lo strumento bioinformatico BLASTP (protein BLAST), sfruttando l'algoritmo di BLOSUM62. Le sequenze proteiche di riferimento umane (RefSeq) sono state allineate a coppie per valutare le differenze filogenetiche, utilizzando il "virus dell'influenza A (A/Hong Kong/1073/99(H9N2))" come query. La valutazione delle omologie è stata effettuata considerando parametri quali l'E-Value, la percentuale di identità, il max score e la query coverage. Successivamente, ogni sequenza proteica di riferimento è stata allineata rispetto alle sequenze dei vari ceppi ospiti, utilizzando ciascuna delle sequenze di riferimento umane (Refseq) come query: A/Korea/426/1968(H2N2), A/Shanghai/02/2013(H7N9), A/California/07/2009(H1N1), A/Puerto Rico/8/1934(H1N1), A/New York/392/2004(H3N2) e A/Hong Kong/1073/99(H9N2). Ciò ha permesso di confrontare le variazioni tra le diverse spe-

cie. I risultati degli allineamenti sono stati visualizzati come alberi filogenetici mediante il metodo Fast Minimum Evolution, con una Max Seq Difference impostata a 0,85.

Analisi di sequenza e selezione delle mutazioni

A seguito dell'analisi evolutiva, sono state selezionate coppie di sequenze amminoacidiche per le proteine di interesse, caratterizzate da una significativa vicinanza evolutiva tra riferimenti umani e gli ospiti diversi. La selezione è stata condotta identificando, sul totale delle valutazioni filogenetiche disponibili per l'analisi, le coppie di sequenze di amminoacidi che mostravano la maggiore vicinanza evolutiva tra i diversi sierotipi virali.

I risultati dell'allineamento sono stati successivamente visualizzati utilizzando il visualizzatore grafico "NCBI Sequence Viewer 3.50.0". Nelle sequenze di amminoacidi sono state identificate e confermate possibili mutazioni, precedentemente identificate per ciascuna delle proteine selezionate nelle fasi preliminari. L'analisi delle singole mutazioni in ciascuna coppia di sequenze ha permesso di identificare l'ospite con una o più mutazioni presenti in due o più delle proteine selezionate condivise con uno o più genomi umani di riferimento.

RISULTATI

Proteine e mutazioni coinvolte nello spillover

La revisione sistematica della letteratura scientifica negli ultimi 10 anni ha identificato 50 rapporti scientifici che forniscono prove sperimentali sulla correlazione tra mutazioni di amminoacidi e fenomeni come il salto di specie, l'adattamento a diversi ospiti e la trasmissione interumana. La revisione della letteratura ha rivelato 8 proteine del virus dell'influenza aviaria di tipo A associate a questi meccanismi: Proteina di base della polimerasi 1 (PB1), Proteina di base della polimerasi 2 (PB2), Polimerasi acida (PA), Nucleoproteina (NP), Emoagglutinina (HA), Neuraminidasi (NA), Proteina della matrice 2 (M2) e Proteina non strutturale 1 (NS1). In totale sono state riscontrate 156 mutazioni coinvolte, distribuite tra le 8 proteine: 26 in PB1, 38 in PB2, 41 in PA, 5 in NP, 32 in HA, 12 in NA, 4 in M2 e 3 in NS1 (Tabella 1).

Tabella 1. Mutazioni riportate in letteratura scientifica, associate alle proteine e sottotipi correlati, potenzialmente implicate nello spillover del virus dell'influenza A.

Protein	Mutation	Serotypes
PB1	<i>H99Y, K577E, N47S, Q694H, I695K, R486K, V709I, E39I, G58I, T66I, G580, A660, T296R, E180D, M317V, R691K, 473R, L13P, 398Q, G70, V504, P69, S42, S375N, K52R, L212V</i>	H5N1, H9N2, H7N4, H17N10, H18N11, H7N9, H2N2, H1N1, H3N2, H5N2, H5N8, H6N5
PB2	<i>E627K, G590S, Q591R, H274Y, I222K, D701N, K683T, S155N, K526R, I382S, R389K, E120D, V227I, S265, F406Y, Q591K, L386V, V649I, I66M, I109V, I133V, E158G, G591R/K, V504, 615R, 558T, 714S, L13P, 398Q, G70, P69, S42, A274T, E129K, K702R, E543D, A655Y</i>	H5N1, H9N2, H7N9, H7N4, H9N2, H17N10, H18N11, H7N7, H2N2, H1N1, H3N2, H5N2, H5N8, H6N5
PA	<i>S388R, A448E, S49Y, D374G, T97I, I178M, M374T, V450A, E684G, F35L, K142E, P224S, L259P, I550L, T552S, M21I, S616P, E141K, N383D, M311I, R204K, P190S, Q400P, V127, L550, L627, 615R, 558T, L672, G18E, R388S, E448A, A36T, S37A, T85I, G186S, L336M, A343S/T, K356R, N409S</i>	H5N1, H7N9, H6N1, H9N2, H1N1, H5N2, H17N10, H18N11, H7N7, H7N3, H5N8
NP	<i>N319K, I109T, Q357K, 105V, N52</i>	H5N1, H5N2, H1N1, H7N9
HA	<i>K165E, Q226L, N224K, G228S, V186G\K, K193T, A118T, S123N, A131V, R136K, L173I, M232I, H17, Y17, H106, H111, G225D, Q222L, G224S, G212R, N173H, N158D, T160A, T318I, H110Y, S138A, G186V, T221P, M66I, S141P, L322Q</i>	H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H6N1, H10N8, H7N9, H10N4, H9N2
NA	<i>L204M, G147R, Deleted region residue 69 to 73, H274Y, I222K, H275Y, I117T, E368K, S416G, A46D, S319F, S430G</i>	H3N2, H5N1, H7N9
M2	<i>V27A, V27T, S31G, S31N</i>	H5N1, H7N9
NS1	<i>P42S, I176T, K217T</i>	H5N1, H7N9, H5N2

Tra queste mutazioni, 10 sono condivise tra diverse proteine: PB1 e PB2 condividono 6 mutazioni (L13P, 398Q, G70, V504, P69, S42), PA e PB2 condividono 2 mutazioni (615R, 558T) e NA e PB2 condividono 2 mutazioni (H274Y, 122K).

La revisione sistematica ha anche evidenziato una significativa diversità sierotipica, riportando un totale di 17 sierotipi del virus dell'influenza aviaria A: H5N1, H9N2, H7N4, H17N10, H18N11, H7N9, H2N2, H1N1, H3N2, H5N2, H5N8, H6N5, H7N7, H6N1, H7N3, H10N8 e H10N4.

Dataset proteico

La ricerca delle proteine di interesse sul database NCBI Virus ha identificato un totale di 9002 sequenze proteiche riconducibili al virus dell'influenza aviaria di tipo A (taxid 11320), con una distribuzione qualitativamente differente in funzione del tropismo di specie considerato: 1975 sequenze da *Homo sapiens* (uomo), 1271 da *Gallus gallus* (pollo), 172 da *Canis lupus familiaris* (cane), 20 da *Felis catus* (gatto domestico), 1511 da *Sus scrofa* (maiale), 372 da *Meleagris gallopavo* (tacchino), 22 da *Cygnus* (cigno), 76 da *Anser* (oca), 55 da *Laridae* (gabbiano) e 1435 da *Anas* (anatra) (Figura 1).

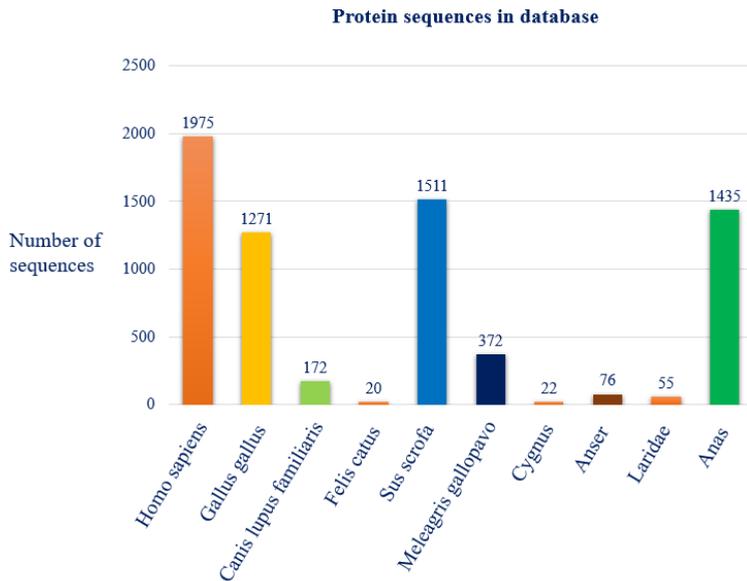


Figura 1. Distribuzione delle sequenze proteiche, tra le specie selezionate, presenti nel database di riferimento “NCBI Virus”.

Dalla totalità delle sequenze proteiche sono state selezionate e scaricate 464 sequenze, rappresentative di 58 isolati virali (Figura 2) appartenenti a 27 diversi sierotipi (H5N2, H7N9, H5N8, H9N2, H10N8, H4N6, H5N1, H7N3, H3N2, H6N1, H5N6, H1N1, H1N2, H2N2, H7N8, H4N8, H12N8, H7N7, H13N2, H13N8, H13N6, H5N9, H13N9, H6N2, H3N8, H7N2, H7N1) (Tabella 2).

Tabella 2. Sierotipi virali delle sequenze presenti nel database associati ai diversi ospiti.

Host	Serotypes
Human	H9N9, H3N2, H1N1, H2N2, H7N9
Chicken	H5N2, H7N9, H5N8, H9N2, H10N8, H4N6, H5N1, H7N3
Dog	H3N2, H6N1
Domestic cat	H5N6, H3N2
Swine	H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H5N2, H9N2
Turkey	H1N1, H2N2, H5N8, H5N2, H7N8, H7N3
Swan	H5N1
Goose	H4N8, H5N2, H5N6, H12N8, H7N7
Seagull	H13N2, H13N8, H13N6, H13N9, H5N9
Duck	H5N1, H5N2, H6N1, H6N2, H5N8, H3N8, H4N6, H7N1, H7N2, H7N3, H7N7, H13N6, H9N2

Tra queste sono incluse 48 sequenze di riferimento (RefSeq) appartenenti all’*Homo sapiens*, pollo (88 proteine), cane (16 proteine), gatto domestico (16 proteine), maiale (48 proteine), tacchino (48 proteine), cigno (8 proteine), oca (40 proteine), gabbiano (40 proteine), anatra (112 proteine). Le fonti documentate di isolamento includono oro-rinofaringe, polmoni, feci e tamponi. Tuttavia, per 23 isolati l’origine non è stata riportata. Inoltre, la distribuzione geografica delle sequenze selezionate comprende un’ampia gamma di aree geografiche, tra cui Stati Uniti, Cina, Regno Unito, Messico, Taiwan, Corea del Sud, Porto Rico, Brasile, Ungheria e Cile (Figura 2).

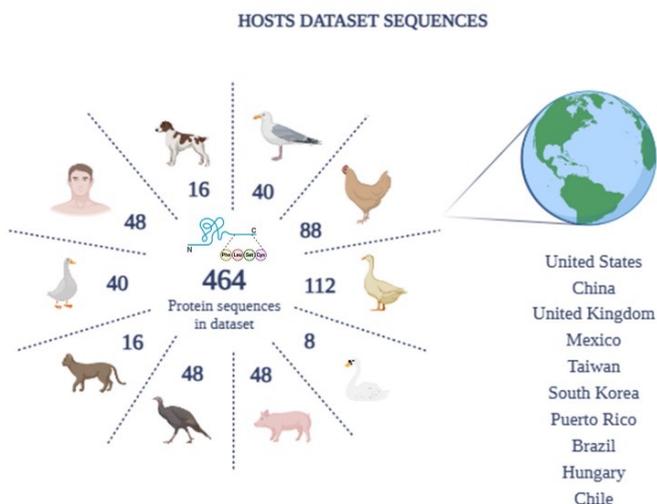


Figura 2. Dataset delle sequenze dettagliato per numero di host e distribuzione geografica.

Analisi dell'allineamento e delle relazioni filogenetiche

L'allineamento multiplo delle sequenze proteiche umane di riferimento (RefSeq) per le otto proteine analizzate ha prodotto risultati significativi per ciascuna di esse. Le proteine PB2, PB1, PA, NP, M2 e NS1 hanno mostrato alte percentuali di identità, generalmente superiori al 90%, con una query coverage quasi completa.

Tra queste, la proteina NS1 ha registrato valori di identità leggermente inferiori rispetto alle altre, con un massimo dell'89,86%. Per la proteina PB2, la query coverage ha raggiunto il 100% in tutte le sequenze analizzate. Le percentuali di identità variavano tra il 93,68% e il 96,44%, mentre gli E-Value erano pari a 0,0. Gli score di appaiamento massimi variano da 1500 a 1532, con il valore più alto associato al ceppo A/Shanghai/1/2013 (H7N9) e il più basso con il ceppo A/New York/392/2004 (H3N2).

La proteina PB1 ha mostrato valori altrettanto elevati, con una query coverage del 99%, un E-Value di 0,0 e percentuali di identità che vanno dal 94,97% (A/California/07/2009(H1N1)) al 96,96% (A/Korea/426/1968(H2N2)). Gli score di allineamento variano da 1533 a 1554, con il valore più alto attribuito alla sequenza del ceppo A/Korea/426/1968 (H2N2) (Figura 3).

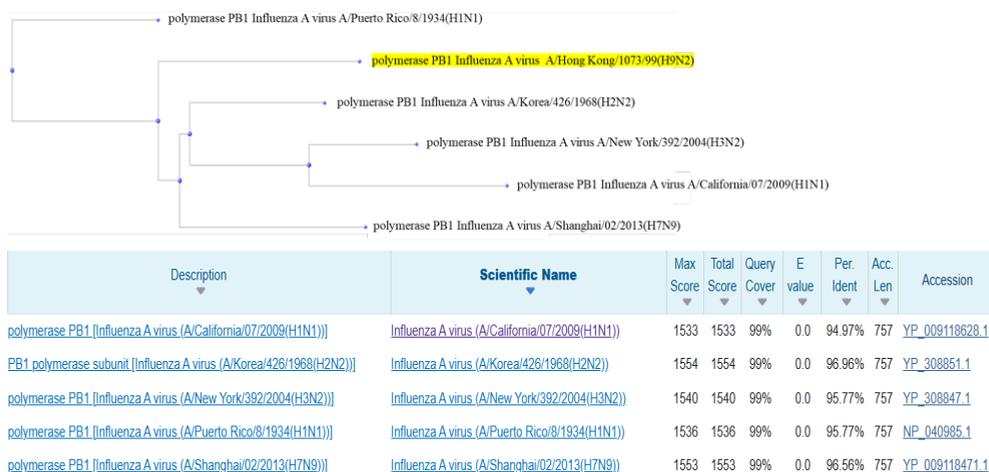


Figura 3. Visualizzazione filogenetica e risultati dell'allineamento tra le sequenze correlate alla proteina PB1 di tutte le sequenze di riferimento umane.

Gli allineamenti di sequenza della proteina PA mostrano score massimi che vanno da 1395 a 1439, con il valore più alto trovato nel ceppo A/Shanghai/02/2013 (H7N9). La query coverage è del 100% nella maggior parte delle sequenze, con percentuali di identità comprese tra il 92,18% e il 95,25%. Il valore massimo è stato osservato per il ceppo A/Shanghai/02/2013(H7N9), mentre il valore minimo per il ceppo A/New York/392/2004(H3N2).

Per la proteina NP, i punteggi massimi sono compresi tra 959 e 1011, con una query coverage del 100% e un E-Value di 0,0. Le percentuali di identità variano dal 90,56%

al 96,99%, con il valore più alto associato al ceppo A/Shanghai/02/2013 (H7N9) e il più basso con il ceppo A/New York/392/2004 (H3N2).

La proteina M2 ha mostrato E-Value molto bassi, compresi tra $1e-67$ (A/Shanghai/02/2013(H7N9)) e $8e-63$ (A/Korea/426/1968(H2N2)). I punteggi massimi variavano da 172 a 186, con una query coverage del 100% e percentuali di identità comprese tra l'83,51% e il 90,72%, con il valore massimo associato al ceppo A/Shanghai/02/2013(H7N9). La proteina NS1 mostra una variabilità più elevata, con percentuali di identità che vanno dal 78,70% all'89,86% rispettivamente nei ceppi A/California/07/2009(H1N1) e A/Korea/426/1968(H2N2). I punteggi massimi vanno da 375 a 412, con una query coverage del 100% per la maggior parte delle varietà. Gli E-Value vanno da $1e-141$ a $3e-138$.

Il secondo gruppo di proteine, caratterizzato da percentuali di identità più basse, comprende le proteine HA e NA. Per la proteina HA, i punteggi massimi vanno da un valore di 430, registrato per il ceppo A/New York/392/2004(H3N2), fino a 604 per il ceppo A/Puerto Rico/8/1934(H1N1). La query coverage varia tra il 96% e il 100% e la maggior parte degli E-Value è uguale a 0,0. Le percentuali di identità mostrano una certa variabilità, con un minimo del 40,21% per A/New York/392/2004(H3N2), e un massimo del 53,01% per A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) (Figura 4).

Gli allineamenti per la proteina NA hanno prodotto punteggi massimi che vanno da 359 a 863. Anche in questo caso, la query coverage è elevata, con valori compresi tra il 99% e il 100%. Gli E-Value erano 0,0 per i ceppi A/Korea/426/1968 (H2N2) e A/New York/392/2004 (H3N2), mentre per A/Shanghai/02/2013 (H7N9), A/California/07/2009 (H1N1) e A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), sono rispettivamente $3e-131$, $4e-128$ e $4e-124$. Le percentuali di identità mostrano valori che vanno da un minimo del 42,98% per A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) a un massimo dell'87,42% per A/Korea/426/1968(H2N2).

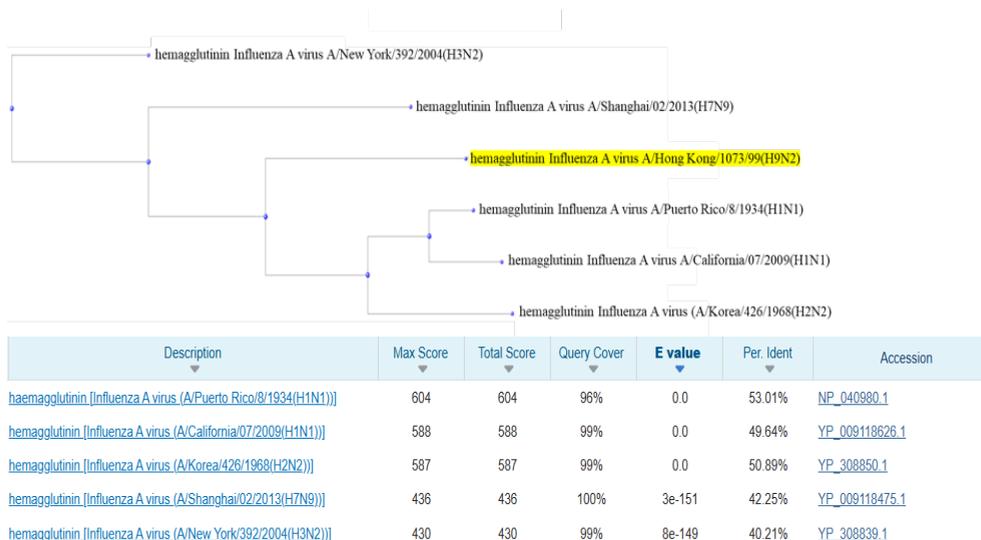


Figura 4. Albero filogenetico e risultati dell'allineamento tra le sequenze proteiche HA di tutte le sequenze di riferimento umane.

L'allineamento delle sequenze proteiche delle 8 proteine analizzate, provenienti dalle 6 sequenze umane di riferimento, con le sequenze proteiche di ciascun ceppo appartenente ai 9 ospiti animali selezionati, ha prodotto un totale di 432 allineamenti, ciascuno visualizzato come albero filogenetico.

Prossimità evolutiva e mutazioni condivise

L'analisi della prossimità evolutiva ha permesso la selezione di 55 alberi filogenetici (Figura 5), da cui sono state ulteriormente selezionate 92 coppie di sequenze amminoacidiche appartenenti. Nello specifico, 15 coppie sono correlate alla proteina PB1, 13 a PB2, 18 a PA, 11 a M2 e 35 alla proteina NS1 (Figura 5). Le altre 3 proteine analizzate nelle fasi precedenti (HA, NA e NP) sono state escluse dall'analisi finale poiché non soddisfacevano i criteri di prossimità evolutiva stabiliti.

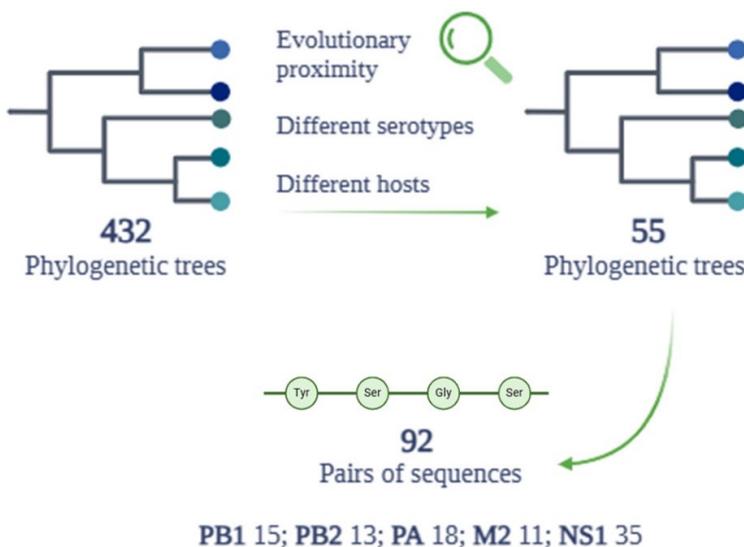


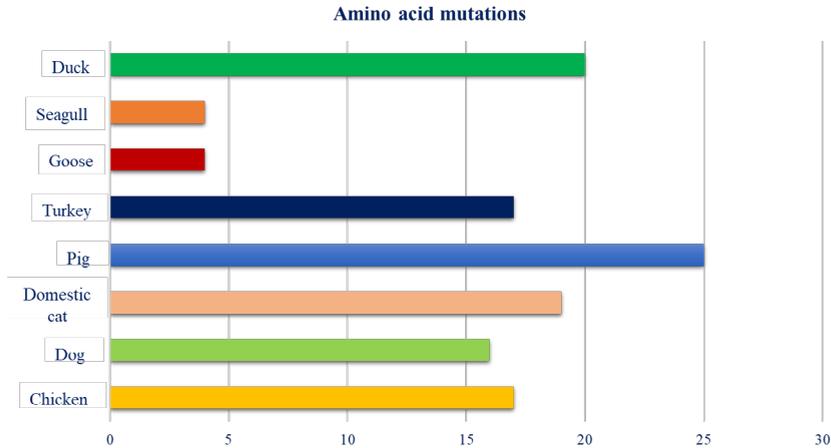
Figura 5. Risultati dell'allineamento tra le sequenze proteiche di tutte le sequenze di riferimento umane.

Delle 92 coppie di sequenze di amminoacidi confrontate, 75 hanno mostrato la presenza di mutazioni associate allo spillover. Di questi, 6 provenivano da pollo, 6 da cane, 8 da gatto, 14 da maiale, 18 da tacchino, 2 da oca, 7 da gabbiano e 19 da anatra.

In totale, l'analisi ha identificato 30 mutazioni amminoacidiche nel confronto tra le sequenze dell'ospite e i genomi umani di riferimento, suddivise tra le proteine come segue: 4 per PB1 (R691K, L13P, S375N, K52R), 4 per PB2 (K683T, V504, R389K, 714S), 20 per PA (E684G, P224S, L259P, I550L, P190S, V127, L672, G18E, R388S, E448A, S37A, N383D, L336M, Q400P, 615R, R204K, T85I, G186S, K356R, N409S), 1 per M2 (S31N) e 1 per NS1 (P42S). Tutti gli ospiti selezionati hanno mostrato mutazioni nelle loro sequenze di amminoacidi, ad eccezione del cigno, che non ha mostrato allineamenti significativi. Le mutazioni appartenenti alle sequenze dell'ospite hanno

mostrato le seguenti distribuzioni: 17 nel pollo, 16 nel cane, 19 nel gatto, 25 nel maiale, 17 nel tacchino, 4 nell'oca, 4 nel gabbiano e 20 nell'anatra (Figura 6).

Figura 6. Distribuzione delle mutazioni amminoacidiche, tra le specie selezionate, presenti nel dataset creato.



Il virus A/chicken/TC/a504/2015(H5N2) presenta mutazioni nelle proteine PB1 condivise con il ceppo virale a tropismo umano (R691K, L13P) e PB2 (K683T, V504, 714S) (Figura 7).

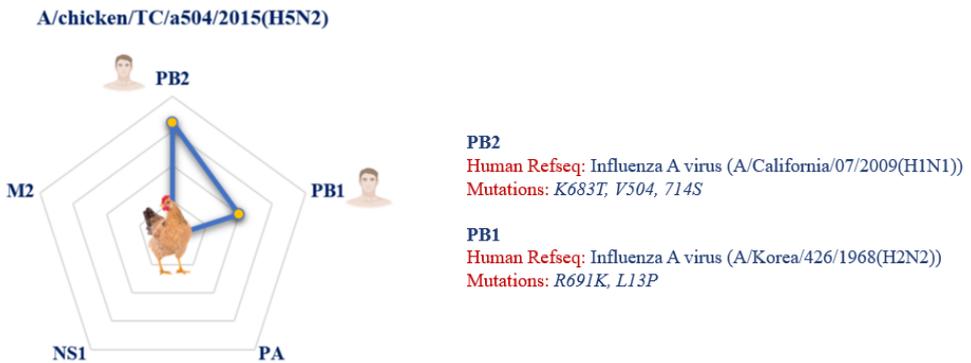


Figura 7. L'immagine illustra la relativa vicinanza di proteine con mutazioni amminoacidiche implicate nello spillover, evidenziando il ceppo virale isolato dal pollo che condivide il maggior numero di mutazioni con le sequenze umane di riferimento. Nel radar plot, La vicinanza all'uomo evidenzia il numero significativo di mutazioni condivise. La legenda mostra, per ogni proteina, le mutazioni amminoacidiche condivise tra ceppi virali di origine animale e ceppi umani. Sono elencate, inoltre, le sequenze umane di riferimento (Human RefSeq) scaricate dal database NCBI Virus, con le quali i ceppi animali condividono queste mutazioni.

Analogamente, il virus A/chicken/Jalisco/CPA-01858-16-CENASA-95294/2016(H7N3) mostra mutazioni significative nella proteina PA (E684G, P224S, L259P, I550L, P190S, V127, L672, G18E, R388S, E448A, S37A) e nella proteina NS1 (P42S). Un altro isolato da pollame, A/chicken/England/474-016250/2014(H4N6), ha un profilo genetico simile, con le stesse mutazioni riscontrate in PA e NS1. Il virus A/canine/Taiwan/E01/2014(H6N1) ha mutazioni in PB1 (R691K, L13P) e PA (E684G, L259P, I550L, N383D, P190S, V127, L672, E448A, S37A, L336M, G18E), mentre nel caso di A/felino/Korea/FY028/2010(H3N2) sono state identificate mutazioni nella proteina PA (E684G, P224S, L259P, I550L, N383D, P190S, Q400P, V127, 615R, L672, G18E, E448A, S37A) e in PB2 (K683T, V504, 714S). Un altro isolato, A/cat/Sichuan/SC18/2014 (H5N6), mostra mutazioni in PB1 (R691K, S375N, L13P) e PB2 (K683T, V504, 714S). Il virus A/swine/Shandong/SD1/2014(H5N1) mostra mutazioni più complesse, che coinvolgono PB1 (R691K, L13P, S375N), PB2 (K683T, V504, 714S), PA (P224S, L259P, I550L, N383D, P190S, V127, L672, G18E, E448A, S37A) e NS1 (P42S). Mutazioni simili sono state riscontrate anche in A/suini/Messico/GtoD-MZC02/2014 (H5N2), con PB1 (R691K, L13P) e PA (P224S, L259P, I550L, N383D, P190S, V127, L672, G18E, E448A, S37A). Nel caso di A/swine/Yantai/16/2012 (H9N2), sono state riscontrate mutazioni in PB1 (L13P, K52R) e NS1 (P42S). Il virus A/turkey/Missouri/16-014037-7/2016(H5N1) presenta mutazioni in PA (E684G, P224S, L259P, I550L, N383D, P190S, Q400P, V127, L672, G18E, E448A, S37A) e NS1 (P42S). Un altro isolato, A/turkey/California/8199/2015 (H7N3), mostra mutazioni in PB2 (K683T, R389K, V504, 714S) e NS1 (P42S). Il ceppo A/wild bird/Chile/1805/2008(H5N9) presenta mutazioni in PB2 (K683T, V504, 714S) e NS1 (P42S). Il virus A/verde acqua/Nanji/NJ-101/2014 (H9N2) ha mutazioni in PB2 (K683T, R389K, V504, 714S), M2 (S31N) e NS1 (P42S), mentre A/alzavola comune/Nanji/NJ-262/2013 (H6N2) ha mutazioni in PB1 (R691K) e PA (P224S, E684G, L259P, I550L, N383D, P190S, Q400P, V127, L672, G18E, E448A, S37A). Tra tutte le specie animali, il ceppo “A/swine/Shandong/SD1/2014(H5N1)” ha mostrato il maggior numero di mutazioni (17 in totale), correlate al maggior numero di proteine (4 su 5), in comune con le sequenze umane di riferimento (Figura 8).



Figura 8. L’immagine illustra la relativa vicinanza di proteine con mutazioni aminoacidiche implicate nello spillover, evidenziando il ceppo virale isolato dai suini che condivide il maggior numero di mutazioni con le sequenze umane di riferimento.

DISCUSSIONE

Il presente studio ha evidenziato il ruolo fondamentale delle mutazioni amminoacidiche nel fenomeno di spillover del virus dell'influenza aviaria, analizzando 156 mutazioni distribuite su otto proteine virali: PB2, PB1, PA, NP, HA, NA, M2 e NS1. La revisione sistematica della letteratura scientifica recente, oltre ad essere propeudeutica all'analisi bioinformatica delle sequenze, è stata uno strumento importante per poter identificare all'interno dei dati forniti dalla comunità scientifica, quali e quante mutazioni sono considerate potenzialmente responsabili del fenomeno dello spillover. Tra queste, le proteine PB1, PB2 e PA hanno mostrato un'alta frequenza di mutazioni condivise tra alcune specie animali e le sequenze umane di riferimento. La proteina PB1 svolge un ruolo essenziale nella replicazione virale, le mutazioni osservate in diversi ospiti agiscono ottimizzando l'interazione con le proteine specie-specifiche. Le mutazioni R691K, L13P e S375N sono state trovate in polli, suini e gatti, dimostrando la loro rilevanza nel contesto della trasmissione interspecie. La mutazione R691K, essendo associata ad un aumento dell'efficienza replicativa nelle cellule di mammifero (An et al., 2023), suggerisce che la sostituzione potrebbe ottimizzare tale replicazione nelle specie non aviarie. Situato nel dominio N-terminale, L13P introduce una maggiore flessibilità strutturale, migliorando le interazioni con PA e la stabilità del complesso polimerasi. Questa mutazione, riscontrata nei polli, nei suini e nelle anatre, è anche associata ad un aumento dell'efficienza replicativa del virus nelle cellule dei mammiferi, contribuendo al suo adattamento interspecifico. Un altro aspetto di grande interesse è rappresentato dalla mutazione S375N, osservata in ceppi virali appartenenti a suini e gatti. Questa alterazione è stata riscontrata in ceppi che mostrano una vicinanza evolutiva ai genomi umani e potrebbe essere correlata ad un miglioramento della stabilità del complesso ribonucleoproteico (RNP) in diversi ambienti cellulari, favorendo l'adattamento del virus a nuovi ospiti (Yeo et al., 2018). Inoltre, le mutazioni amminoacidiche rilevate in PB1 hanno mostrato una particolare distribuzione tra i sierotipi analizzati. Nei ceppi H5N1 e H7N9 alcune mutazioni possono essere associate ad una maggiore patogenicità e capacità di diffondersi tra i mammiferi. Durante l'analisi, sono state identificate 4 mutazioni nella proteina PB2 (K683T, V504, R389K, 714S), la maggior parte delle quali correlate all'adattamento interspecifico e all'efficienza di replicazione. La mutazione K683T, essendo vicina alla regione coinvolta nel legame del cappuccio dell'RNA messaggero dell'ospite, potrebbe migliorare la capacità della polimerasi di trascrivere in modo efficiente l'RNA virale (Qu et al., 2020). La mutazione V504 evidenzia anche un possibile meccanismo di coordinazione tra le proteine del complesso polimerasi (Yehia et al., 2023). Questa alterazione è stata rilevata in ceppi di ospiti come polli, maiali e anatre, specie già note per il loro ruolo di serbatoi di virus zoonotici. La mutazione R389K, invece, è stata trovata in ceppi isolati da tacchini e suini. In questo caso va sottolineato che questa sostituzione si trova in una regione critica della sequenza proteica implicata nell'interazione di PB2 con altre proteine RNP (PA e PB1) che ne aumentano la stabilità nelle cellule ospiti. Un'altra mutazione in PB2 implicata nel legame dell'RNP e nella traslocazione nucleare è 714S, che è stata rilevata in ceppi di polli e suini. Dal punto di vista funzionale, il PB2 interagisce anche con specifici recettori dell'ospite. Sebbene questo studio non abbia incluso analisi strutturali in silico, la letteratura suggerisce che mutazioni come K683T e 714S potrebbero influenzare il legame della proteina ai recettori nucleari, miglio-

rando la traslocazione del complesso polimerasi nelle cellule (Qu et al., 2020). Inoltre, sono state identificate 20 mutazioni associate alla proteina PA (E684G, P224S, L259P, I550L, P190S, V127, L672, G18E, R388S, E448A, S37A, N383D, L336M, Q400P, 615R, R204K, T85I, G186S, K356R, N409S), molte delle quali sono legate allo spillover. Le interazioni molecolari con altre proteine e con la cellula ospite che esegue PA sono ottimizzate da queste mutazioni. Tra tutte, le mutazioni più significative sono state E684G che è nota per essere associata ad un aumento dell'efficienza della scissione del cappuccio (Guo et al., 2023), presente in suini, tacchini e gatti, P224S che potrebbe influenzare il legame a PB1 e la mutazione L259P identificata in isolati di pollo e suino, che secondo alcuni studi potrebbe aumentare la capacità del virus di elaborare l'RNA messaggero dell'ospite, accelerando così il ciclo di replicazione virale (Zhao et al., 2016). Inoltre, è importante evidenziare la presenza di mutazioni come I550L e R388S. Il primo, frequentemente rilevato nei ceppi di tacchino e maiale, migliora l'efficienza virale agendo sull'affinità di legame per i recettori cellulari, il secondo riveste un ruolo fondamentale poiché potrebbe migliorare la cooperazione tra PA e PB1, aumentando la stabilità del complesso polimerasi (Arai et al., 2020). Le mutazioni condivise tra le sequenze umane e animali identificate nelle proteine M2 e NS1 non devono essere sottovalutate. Per ciascuna di queste proteine, è stata trovata solo una mutazione condivisa tra diversi ospiti, S31N in M2 e P42S in NS1, rispettivamente. Queste mutazioni migliorano la sopravvivenza cellulare e la capacità di eludere le difese immunitarie dell'ospite. La sostituzione S31N nella proteina M2 è stata trovata in ceppi di specie come anatre e gabbiani. È importante evidenziare che la sostituzione della serina con un'asparagina nel canale protonico virale conferisce un'augmentata resistenza ai farmaci antivirali come l'amantadina. La diffusione di S31N nei ceppi zoonotici indica che questa alterazione rappresenta un adattamento favorevole che potrebbe migliorare la sopravvivenza del virus in nuovi contesti ecologici, aumentando la probabilità di spillover. La mutazione P42S nella proteina NS1, osservata nei ceppi di pollo, maiale e tacchino, induce un cambiamento strutturale nella regione funzionale della proteina coinvolta nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite (Wang et al., 2013). La sostituzione della prolina con una serina potrebbe migliorare l'interazione di NS1 con i fattori cellulari responsabili della risposta antivirale innata, aumentando così la capacità del virus di eludere i meccanismi di difesa dell'ospite. Questa mutazione sembra ottimizzare la virulenza e la replicazione virale, fornendo al virus un vantaggio selettivo durante lo spillover. L'analisi bioinformatica di isolati provenienti da ospiti animali accoppiati a sequenze di riferimento umane ha dimostrato che alcuni di questi ceppi presentano un numero considerevole di mutazioni condivise con l'uomo. Di importanza sperimentale, e rafforzando le ipotesi di questo studio, è il fatto che queste mutazioni condivise in proteine chiave provengono da suini, polli, anatre e gatti, specie animali con un significativo potenziale zoonotico e in alcuni casi con spiccata sinantropia. Un primo esempio è il ceppo A/swine/Shandong/SD1/2014(H5N1), isolato da suini, che è caratterizzato dalla presenza di 17 mutazioni distribuite in quattro proteine principali: PB1, PB2, PA e NS1. Nel PB1, mutazioni come L13P e R691K ottimizzano la stabilità del complesso polimerasi e aumentano l'efficienza replicativa del virus. In PB2, alterazioni come K683T e V504 favoriscono il trasporto nucleare del complesso ribonucleoproteico, migliorando l'adattamento a nuovi substrati cellulari. La proteina PA mostra anche mutazioni significative, tra cui E684G, L259P

e P224S, che aumentano l'attività della nucleasi, accelerando la sintesi dell'RNA virale. Infine, NS1 presenta la mutazione P42S, che aumenta l'evasione della risposta immunitaria innata. La combinazione di queste mutazioni rende il ceppo A/swine/Shandong/SD1/2014(H5N1) un esempio rappresentativo di un virus altamente adattato e potenzialmente pericoloso per l'uomo, evidenziando il ruolo del maiale come serbatoio critico per il riassortimento genomico.

Il ceppo A/chicken/TC/a504/2015(H5N2) presenta mutazioni in PB1 e PB2. Questo ceppo evidenzia come i polli possano fungere da "ponti evolutivi", facilitando il riassortimento genomico tra ceppi aviari e varianti adattate all'uomo.

Il tacchino emerge come un altro ospite rilevante, come dimostrato dal ceppo A/turkey/Missouri/16-014037-7/2016(H5N1). Questo isolato presenta mutazioni in PB2, PA e NS1 che anche in questo caso aumentano le interazioni con il complesso polimerasi e la capacità di replicazione. Il ruolo del tacchino come serbatoio intermedio per i virus zoonotici è quindi evidenziato dalla presenza di mutazioni critiche. Tra le specie selvatiche, le anatre rimangono un serbatoio naturale di virus dell'influenza aviaria, come dimostrato dal ceppo A/alzavola comune/Nanji/NJ-101/2014 (H9N2). Questo isolato presenta mutazioni significative in PB2, M2 e NS1.

Anche le specie meno comunemente associate a questi virus, come i gatti, hanno mostrato ceppi con mutazioni rilevanti. Il ceppo A/felino/Korea/FY028/2010 (H3N2) presenta mutazioni in PB1 e PB2, tra cui L13P e R691K in PB1, che migliorano la replicazione virale, e K683T in PB2, che ottimizza il trasporto nucleare.

Uno dei limiti del presente studio riguarda la natura del set di dati bioinformatici, che riflette solo gli isolamenti disponibili nel database NCBI Virus. Questi dati, sebbene rappresentativi, sono spesso incompleti e mancano di informazioni cruciali come il contesto ecologico o le interazioni specifiche tra gli ospiti. La mancanza di esperimenti in vitro e in vivo utili a validare le ipotesi formulate ci impedisce di confermare con certezza il ruolo funzionale delle mutazioni, che, seppur precedentemente confermate attraverso studi pubblicati in letteratura e rivisti nella prima fase dello studio, rimangono sempre limitate a specifici contesti geografici, senza considerare le interazioni tra specie nelle dinamiche di trasmissione. Il metodo utilizzato, pur valutando le specie maggiormente implicate nella trasmissione e nell'epidemiologia del virus dell'influenza aviaria, non integra strumenti in grado di fornire modelli epidemiologici avanzati. Inoltre, l'analisi sperimentale di questo studio si è limitata all'identificazione delle mutazioni fino ad ora note alla comunità scientifica. I limiti descritti, oltre a contestualizzare i risultati, mostrano come le prospettive legate a questo studio siano ampie e multidisciplinari. I prossimi passi di questo studio devono essere legati alla validazione in vitro e in vivo delle mutazioni per comprendere meglio le interazioni molecolari tra ospite e virus, questo può essere necessario anche con l'aiuto delle scienze omiche integrate. Approcci computazionali come il docking molecolare, in grado di prevedere i cambiamenti strutturali causati dalle mutazioni e le loro implicazioni nell'affinità di legame con i recettori di diversi ospiti, aiutano a comprendere meglio i meccanismi molecolari alla base di un potenziale spillover (Ford et al., 2025). Questi strumenti, integrati con software in grado di simulare variazioni strutturali dovute a cambiamenti di sequenza e di applicare algoritmi predittivi per la struttura delle proteine, ci permettono di ottenere modelli dettagliati che illustrano come specifiche mutazioni influenzino la conformazione delle proteine virali. Il miglioramento del metodo di raccolta e analisi dei dati epi-

demiologici, grazie all'integrazione di fonti provenienti da banche dati di istituzioni nazionali e internazionali, potrebbe essere strategico nel rafforzare la capacità di intervenire preventivamente in situazioni di emergenza. Un altro sviluppo necessario riguarda l'integrazione delle metodiche utilizzate in questo studio con modelli matematici e simulazioni epidemiologiche, per poter prevedere e quantificare il rischio di spillover, evitando o gestendo in modo razionale possibili scenari di diffusione del virus. In questo contesto, diventa fondamentale condurre analisi più approfondite della frequenza e della distribuzione delle mutazioni nelle diverse specie ospiti. Opportuni test statistici possono essere utili per identificare tendenze significative nella presenza di mutazioni e valutare la variazione interspecifica.

Rilevare segnali ripetuti di adattamento legati allo spillover attraverso l'analisi statistica migliorerebbe la capacità di interpretare i dati di sorveglianza molecolare. Le mutazioni identificate in questo studio possono essere utilizzate nella progettazione e nello sviluppo di vaccini mirati che considerano le alterazioni amminoacidiche implicate nello spillover. Lo studio ha identificato mutazioni in PB1, PB2 e PA che sono conservate in tutte le specie e possono offrire un'opportunità unica per la progettazione di vaccini universali. Questo, in termini pragmatici, significa che prendendo di mira regioni proteiche altamente conservate negli ospiti, la necessità di aggiornamenti frequenti potrebbe essere ridotta. Un esempio applicativo potrebbe essere lo sviluppo di vaccini che sfruttano la tecnologia dell'RNA messaggero e includono sequenze che codificano per proteine mutanti. I dati raccolti da questo studio potrebbero, insieme a studi futuri, fornire una base di conoscenze per lo sviluppo di vaccini polivalenti. In contesti in cui la vicinanza e l'interazione tra specie animali e uomo è frequente, vaccini in grado di fornire protezione contro un'ampia gamma di sierotipi associati allo spillover potrebbero rappresentare uno strumento strategico di prevenzione (Attwaters, 2023).

Le informazioni fornite da questo studio possono inoltre aprire nuovi scenari nello sviluppo di kit diagnostici avanzati. L'individuazione delle mutazioni chiave associate allo spillover, utilizzando tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), potrebbe essere strategica nella gestione degli interventi sanitari o nella comprensione anticipata delle future dinamiche di trasmissione. Strumenti diagnostici molecolari che rilevano la presenza di mutazioni potrebbero trovare applicazioni sul campo nel monitoraggio di ceppi virali ad alto rischio zoonotico. In questo senso, i kit diagnostici sindromici potrebbero portare a una valutazione del rischio più completa. L'individuazione precoce delle mutazioni associate allo spillover consentirebbe alle autorità sanitarie e ad altri soggetti di intervenire tempestivamente attraverso misure di contenimento, prevenendo la diffusione di ceppi ad alto rischio. L'ipotesi centrale dello studio è che queste mutazioni rappresentino una firma molecolare del processo di adattamento interspecifico, favorendo la stabilità del complesso ribonucleoproteico, l'interazione con le proteine dell'ospite e la modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. Questa visione è supportata anche dall'identificazione di mutazioni di conservazione in M2 e NS1, già note per la loro capacità di eludere le difese immunitarie e conferire resistenza ai farmaci antivirali (Ma et al, 2021). In definitiva, lo studio evidenzia come l'analisi combinata delle mutazioni chiave e delle traiettorie filogenetiche dei virus AIV possa fornire una base di conoscenze essenziale per la previsione e la prevenzione di future pandemie.

CONCLUSIONI

Per ottenere questi risultati, lo studio si è basato su un approccio prevalentemente bioinformatico. Il database “NCBI Virus” e strumenti come “BlastP” accoppiati ad algoritmi di costruzione filogenetica come “Fast Minimum Evolution” ci hanno permesso di rilevare le relazioni evolutive tra sequenze animali e umane, producendo 432 alberi filogenetici in totale. Lo studio ha avuto l’obiettivo di evidenziare come l’integrazione tra valutazioni evolutive e rilevamento di mutazioni chiave sia necessaria, per poter evidenziare la distribuzione tra gli ospiti e fornire basi molecolari per la comprensione del rischio zoonotico. L’identificazione di mutazioni condivise tra ceppi umani e animali potrebbe essere utilizzata per sviluppare modelli matematici predittivi che quantifichino il rischio di spillover, supportando anche la sorveglianza genomica avanzata, potenzialmente integrata nei programmi di salute pubblica per monitorare e prevenire gli eventi pandemici. L’uso di questo approccio implica la contestualizzazione dei risultati e la valutazione di tutti i limiti, nonostante ciò, questo studio può fornire una solida base per ulteriori ricerche e interventi mirati. In conclusione, lo studio condotto si propone di rappresentare un avanzamento nella comprensione dei meccanismi molecolari ed evolutivi associati al virus dell’influenza aviaria, fornendo una base sperimentale fondamentale per lo sviluppo di interventi sanitari più efficaci e per la progettazione di studi sperimentali avanzati.

BIBLIOGRAFIA

1. AbuBakar U, Amrani L, Kamarulzaman FA, Karsani SA, Hassandarvish P and JE Khairat. (2023). Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses*. 15:833.
2. An SH, Hong SM, Song JH, Son SE, Lee CY, Choi KS and HJ Kwon. (2023). Engineering an Optimal Y280-Lineage H9N2 Vaccine Strain by Tuning PB2 Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 24(10): 8840
3. Arai Y, Kawashita N, Elgendy EM, Ibrahim MS, Daidoji T, Ono T, Takagi T, Nakaya T, Matsumoto K and Y Watanabe. (2020). PA Mutations Inherited during Viral Evolution Act Cooperatively To Increase Replication of Contemporary H5N1 Influenza Virus with an Expanded Host Range. *J. Virol.* 95(1):e01582-20.
4. Attwaters M. (2023). Broad protection from a single flu vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.* 21(2): 67.
5. Ford CT, Yasa S, Obeid K, Jaimes R 3rd, Tomezsko PJ, Guirales-Medrano S, White RA 3rd and D Janies. (2025). Large-scale computational modelling of H5 influenza variants against HA1-neutralising antibodies. *EBioMedicine*. 114:105632.
6. Guo Y, Bai X, Liu Z, Liang B, Zheng Y, Dankar S and J Ping. (2023). Exploring the alternative virulence determinants PB2 S155N and PA S49Y/D347G that promote mammalian adaptation of the H9N2 avian influenza virus in mice. *Vet. Res.* 54(1): 97.
7. Ma Y, Frutos-Beltrán E, Kang D, Pannecouque C, De Clercq E, Menéndez-Arias L, Liu X and P Zhan. (2021). Medicinal chemistry strategies for discovering antivirals effective against drug-resistant viruses. *Chem. Soc. Rev.* 2021. 50(7): 4514-4540.
8. Qu B, Li X, Cardona CJ and Z Xing. (2020). Reassortment and adaptive mutations of an emerging avian influenza virus H7N4 subtype in China. *PLoS One*. 15(1): e0227597.

9. Tilocca B, Paonessa M, De Salvo M and P Roncada. (2024). Mitigating neglected zoonotic infections: A One Health approach on avian influenza in humans and animals. *Gene & Protein in Disease*. 3(1): 2327.
10. Wang J, Wu Y, Ma C, Fiorin G, Wang J, Pinto LH, Lamb RA, Klein ML and WF Degrado. (2013). Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110(4): 1315-20.
11. Yehia N, Rabie N, Adel A, Mossad Z, Nagshabandi MK, Alharbi MT, El-Saadony MT, El-Tarabily KA and A Erfan. (2023). Differential replication characteristic of reassortant avian influenza A viruses H5N8 clade 2.3.4.4b in Madin-Darby canine kidney cell. *Poult. Sci*. 102(7): 102685.
12. Yeo SJ, Than DD, Park HS, Sung HW and H Park. (2019). Molecular Characterization of a Novel Avian Influenza A (H2N9) Strain Isolated from Wild Duck in Korea in 2018. *Viruses*. 11(11): 1046.
13. Zhao H, Chu H, Zhao X, Shuai H, Wong BH, Wen L, Yuan S, Zheng BJ, Zhou J and KY Yuen. (2016). Novel residues in the PA protein of avian influenza H7N7 virus affect virulence in mammalian hosts. *Virology*. 498: 1-8.

PREVALENZA DI CIRCOVIRUS IN PAPPAGALLI PET

Noviello E.¹, Pace A.¹, Santaniello A.¹, Borrelli L.¹, Tucciarone C.M.², Franzo G.², Fioretti A.¹, Cecchinato M.², Dipineto L.¹

¹*Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Delpino 1, 80137 Napoli (NA), Italia;*

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

Summary

The Psittacine Beak and Feather Disease, caused by the Beak and Feather Disease Virus (BFDV), represents a serious threat to parrot species (Psittaciformes), many of which are already endangered due to habitat destruction and illegal trade. Since its first description in Australia, the BFDV has spread globally, largely facilitated by the international pet trade. Within this context, Europe represents a crucial node for viral dissemination, due to the presence of numerous breeding centers, the intense import and export activity, and the colonization of public green areas by non-native parrot populations. This study aimed to evaluate the prevalence of the virus in companion parrots in the Campania region, in order to assess the risk to domestic and wild populations, and contribute to mitigate viral transmission. Between May 2024 and June 2025, a total of 72 pet parrots presented to a veterinary clinic were examined, collecting samples of blood and feathers, which were tested using real-time PCR for the detection of BFDV. The results showed a prevalence of 61.1%, including 48.8% of asymptomatic birds, underlining the role of clinically healthy individuals in the disease epidemiology. No statistically significant differences were observed in prevalence based on sex, age group, or taxonomic origin, suggesting a widespread distribution of the virus in captive populations. The findings emphasize the need to include asymptomatic parrots in surveillance programs, especially in commercial and breeding contexts. Given the presence of wild parrot populations in European cities and their potential interactions with captive birds, there is a significant risk of virus transmission across ecological boundaries. The study highlights the importance of standardized diagnostic protocols, enhanced biosecurity measures, and stricter control of the bird trade. Coordinated international efforts, including legal enforcement and improved hygiene practices, are essential to reduce the spread of BFDV and safeguard avian health and biodiversity.

INTRODUZIONE

Gli Psittaciformi costituiscono un ordine tassonomico che comprende numerose specie native di Africa, Asia, Oceania e Americhe. Tuttavia, circa un quarto di queste specie è attualmente a rischio di estinzione e richiede misure urgenti di conservazione. Oltre alla distruzione degli habitat naturali e al commercio illegale, una delle principali minacce per i pappagalli è rappresentata dalla malattia del becco e delle penne (Psittacine Beak and Feather Disease, PBFD) (Martens et al., 2020). Tale patologia è sostenuta da un circovirus (Beak and Feather Disease Virus, BFDV) e può manifestarsi in forma iperacuta, acuta o cronica, con una sintomatologia aspecifica (e.g., letargia, depressione, anemia), oppure caratterizzata da progressive alterazioni

del piumaggio e del becco, fino alla morte improvvisa. Sebbene gli esemplari infetti possano sopravvivere a lungo, spesso sopraggiungono a morte per infezioni secondarie favorite dall'immunosoppressione indotta dal virus (Bert et al., 2005; Fogell et al., 2016; Franzo et al., 2022).

Dalla sua prima descrizione in Australia, verso la fine del XIX secolo, il BFDV si è diffuso su scala globale, molto probabilmente a causa del commercio internazionale di pappagalli da compagnia. Il virus, altamente contagioso, si trasmette sia per via orizzontale che verticale, con la contaminazione ambientale che assume un ruolo importante nelle strutture ad alta densità, come i centri di allevamento (Fogell et al., 2016; Ko et al., 2024; Molini et al., 2023). In questo contesto, l'Europa rappresenta un nodo cruciale per la diffusione del virus, a causa della presenza di numerosi centri di allevamento e dell'intensa attività di importazione ed esportazione (Franzo et al., 2022). In particolare, l'Italia ospita circa un quarto della popolazione europea di uccelli ornamentali, collocandosi al primo posto tra tutti gli Stati membri. Nonostante l'assenza di Psittaciformi nativi in Europa, il commercio internazionale e l'avicoltura hanno favorito l'insediamento di popolazioni selvatiche stabili di specie non autoctone (e.g., *Psittacula* spp.), che si stanno espandendo nelle regioni temperate, soprattutto in aree urbane con clima favorevole e vegetazione abbondante (Kessler et al., 2020). La colonizzazione di parchi e giardini pubblici da parte di queste popolazioni, solleva preoccupazioni di natura ecologica ed epidemiologica, legate sia all'impatto delle specie invasive sugli ecosistemi locali, sia al rischio di trasmissione di agenti patogeni (Franzo et al., 2022; Kessler et al., 2020; Ko et al., 2024).

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio si propone di monitorare la presenza di circovirus in pappagalli detenuti come animali da compagnia nella Regione Campania, al fine di valutare il rischio per le popolazioni domestiche e selvatiche, e contribuire al contenimento della diffusione virale determinata dai commerci.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra Maggio 2024 e Giugno 2025 sono stati reclutati 72 pappagalli, detenuti come animali da compagnia, pervenuti a visita presso una clinica veterinaria nella provincia di Napoli. Ogni soggetto è stato classificato in base al sesso (determinato tramite sessaggio, quando possibile), alla classe d'età (giovani < 3 anni; adulti ≥ 3 anni), e origine del gruppo tassonomico (specie del Vecchio Mondo vs. specie del Nuovo Mondo). I 72 pappagalli esaminati appartenevano a 13 generi diversi, di cui quattro originari del Nuovo Mondo (37 soggetti) e nove del Vecchio Mondo (35 soggetti). Il sesso è stato identificato in 55 esemplari (37 maschi e 18 femmine), mentre la classe d'età è stata determinata per 64 soggetti (52 giovani e 12 adulti). Campioni di penne e di sangue sono stati prelevati da soggetti clinicamente sani o con sospetta sintomatologia riferibile a PBFV, e analizzati tramite un sistema portatile di real-time PCR per l'identificazione del DNA del BFDV.

L'analisi statistica per valutare eventuali differenze nella prevalenza del virus rispetto alle variabili considerate (sesso, classe d'età, origine del gruppo tassonomico) è stata condotta registrando i dati su foglio Excel e effettuando il test del Chi-quadro attraverso il software Past (Hammer and Harper). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0.05$.

RISULTATI

Tra tutti gli animali esaminati, 44 soggetti (61,1%; IC 95%: 49,6-71,5%) sono risultati positivi alla presenza del BFDV tramite metodica molecolare, senza differenze rilevabili tra le matrici testate. Sebbene oltre la metà dei soggetti esaminati (43/72; 59,7%) non presentasse alcuna sintomatologia, quasi la metà di questi è risultata positiva (21/43; 48,8%). Nel restante 40,3% (29/72) la sintomatologia era variabile, di tipo gastrointestinale, neurologica, o aspecifica, come anche alterazioni del piumaggio o deformazioni del becco. In questo sottogruppo, la prevalenza è risultata del 79,3% (23/29), con una differenza statisticamente significativa rispetto al gruppo degli asintomatici. Non sono emerse differenze statisticamente significative nella prevalenza del BFDV in relazione a sesso, classe d'età od origine del gruppo tassonomico. Tuttavia, la percentuale di soggetti positivi al BFDV è risultata leggermente maggiore in soggetti adulti (8/12; 66,7%) rispetto ai giovani (32/52; 61,5%), nei maschi (23/37; 62,2%) rispetto alle femmine (10/18; 55,6%), e nelle specie originarie del Nuovo Mondo (23/37; 62,2%) rispetto a quelle del Vecchio Mondo (21/35; 60%).

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio mostrano una prevalenza tutt'altro che trascurabile di BFDV nei pappagalli da compagnia nella Regione Campania, sottolineando l'importanza del monitoraggio attivo, della diagnosi precoce e dell'implementazione di rigorose misure di biosicurezza, in particolare in allevamenti e centri di vendita (Ko et al., 2024). La prevalenza osservata risulta notevolmente più alta rispetto a quella riportata in altri studi (Bert et al., 2005; Franzo et al., 2022; Kessler et al., 2020; Ko et al., 2024; Martens et al., 2020; Molini et al., 2023); questo dato potrebbe riflettere il tipo di popolazione esaminata, ovvero esemplari reclutati in ambito clinico e potenzialmente affetti da patologie, quindi con un possibile *bias* di campionamento. Ciononostante, il gran numero di pappagalli infetti asintomatici conferma il loro importante contributo alla contaminazione ambientale e alla diffusione dell'infezione, evidenziando la necessità di includere i soggetti clinicamente sani nei programmi di screening, al fine di ridurre il rischio di trasmissione del virus, soprattutto in contesti commerciali e riproduttivi (Franzo et al., 2022; Ko et al., 2024; Molini et al., 2023). L'assenza di differenze statisticamente significative nella prevalenza del BFDV tra i gruppi presi in considerazione, potrebbe suggerire che il virus sia ampiamente distribuito nella popolazione analizzata, indipendentemente dal sesso, dall'età o dall'origine delle specie.

Nello specifico, studi precedenti hanno riportato una prevalenza di BFDV più elevata tra le specie originarie di Africa, Asia ed Oceania (Bert et al., 2005), mentre il presente studio non mostra differenze significative tra specie di origine diversa, suggerendo che il BFDV possa essere ormai presente in una ampia gamma di popolazioni in cattività, indipendentemente dalla loro provenienza.

Inoltre, lo studio mostra una prevalenza di BFDV più elevata nei pappagalli adulti rispetto ai giovani, sebbene non significativa. Questo risultato è in contrasto con studi precedenti che riportano una maggiore suscettibilità negli esemplari giovani (Bert et al., 2005; Fogell et al., 2016; Martens et al., 2020), ma potrebbe essere spiegato dalla diversa evoluzione clinica dell'infezione. Lo sviluppo di forme croniche o subcliniche negli esemplari adulti potrebbe permettere la sopravvivenza dei soggetti

più a lungo, con maggiore possibilità di essere visitati in una clinica veterinaria e ottenere, quindi, una corretta diagnosi di PBFV. Al contrario, gli individui giovani sono spesso soggetti a forme più gravi (iperacuta ed acuta), che potrebbero causare la morte degli esemplari in assenza di diagnosi.

Infine, la diversa prevalenza di BFDV tra maschi e femmine, osservata in altri studi, potrebbe essere influenzata da fattori confondenti non controllati, come lo stato riproduttivo: è stato infatti suggerito che nei pappagalli maschi l'infezione sia potenzialmente più rilevabile al di fuori della stagione riproduttiva (Martens et al., 2020).

I risultati ottenuti pongono l'attenzione sul contributo dei pappagalli da compagnia, in particolare se infetti asintomatici, nella disseminazione del BFDV, nonostante sia stato spesso considerato meno rilevante del ruolo dei pappagalli selvatici. Tuttavia, la trasmissione da esemplari domestici a selvatici non può essere trascurata, soprattutto in relazione al rischio per le specie in pericolo di estinzione (Fogell et al., 2016; Franzo et al., 2022; Martens et al., 2020; Molini et al., 2023). A questo si aggiunge che, nei contesti urbani europei, le popolazioni di pappagalli non autoctoni, ormai stabilitesi nelle aree verdi pubbliche, potrebbero essere maggiormente esposte a contatti diretti o indiretti con pappagalli da compagnia, aumentando il rischio di trasmissione virale tra l'ambiente domestico e l'ecosistema urbano (Franzo et al., 2022; Kessler et al., 2020). Inoltre, è importante segnalare che il BFDV è stato documentato anche in specie non appartenenti all'ordine degli Psittaciformi, con conseguenze epidemiologiche ancora poco conosciute (Ko et al., 2024). Pertanto, in considerazione della promiscuità tra specie aviarie che può verificarsi in contesti come cliniche veterinarie, centri di recupero, allevamenti o negozi specializzati, e del rischio associato al rilascio (intenzionale o accidentale) di soggetti infetti, si rende necessaria l'adozione di protocolli diagnostici e misure di biosicurezza standardizzate (Fogell et al., 2016; Franzo et al., 2022; Kessler et al., 2020; Ko et al., 2024). Tali strategie dovrebbero essere applicate in tutte le attività che prevedono l'interazione tra uccelli in cattività e avifauna selvatica, al fine di prevenire l'introduzione del virus in popolazioni naturali e contenere la sua diffusione su larga scala.

CONCLUSIONI

La presenza diffusa del BFDV tra le popolazioni di pappagalli detenuti come animali da compagnia rappresenta una minaccia non solo per gli allevatori privati, ma anche per i giardini zoologici, i centri di riabilitazione e i programmi di riproduzione per la conservazione delle specie minacciate (Kessler et al., 2020; Martens et al., 2020). La distinzione fra animali selvatici e domestici è spesso aleatoria, poiché gli individui selvatici sono spesso catturati e venduti come animali da compagnia e gli individui domestici sono talvolta rilasciati accidentalmente o intenzionalmente in natura. Questo scenario rappresenta un chiaro rischio dal punto di vista delle malattie infettive, dal momento che facilita il mantenimento della malattia in natura e rappresenta una fonte di introduzione in ospiti domestici. Il commercio internazionale di pappagalli ha facilitato la diffusione del virus, la ricombinazione genetica e l'emergere di nuove varianti, evidenziando la necessità di studi epidemiologici attraverso analisi genomiche filogenetiche, al fine di sviluppare adeguate strategie di controllo, tra cui la sorveglianza attiva, una rigorosa quarantena per gli esemplari importati, e una migliore igiene, soprattutto nelle strutture a rischio (Franzo et al., 2022; Kessler

et al., 2020; Ko et al., 2024).

Alla luce dell'efficacia dei divieti internazionali nel limitare e controllare il commercio legale di uccelli, sono necessari ulteriori sforzi al fine di ridurre le attività di introduzione illecita e le opportunità che queste generano di trasmissione virale tra le popolazioni di uccelli attraverso i confini e tra gli ambienti selvatici e domestici. Pertanto, è necessaria una solida collaborazione internazionale che includa l'applicazione delle leggi, delle misure di biosicurezza e la possibilità di mezzi di sussistenza alternativi per le comunità che dipendono dalla cattura e dalla vendita di uccelli selvatici. Attraverso questi sforzi coordinati si può sperare di mitigare l'impatto globale della BFDV e proteggere la biodiversità aviaria e la salute degli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. Bert E, Tomassone L, Peccati C, Navarrete MG and SC Sola. (2005). Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 52(2): 64-8.
2. Fogell DJ, Martin RO and JJ Groombridge. (2016). Beak and feather disease virus in wild and captive parrots: an analysis of geographic and taxonomic distribution and methodological trends. *Arch. Virol.* 161(8): 2059-74.
3. Franzo G, Dundon WG, De Villiers M, De Villiers L, Coetzee LM, Khaiseb S, Cattoli G and U Molini. (2022). Phylodynamic and phylogeographic reconstruction of beak and feather disease virus epidemiology and its implications for the international exotic bird trade. *Transbound. Emerg. Dis.* 69(5): e2677-e2687.
4. Kessler S, Heenemann K, Krause T, Twietmeyer S, Fuchs J, Lierz M, Corman VM, Vahlenkamp TM and D Rubbenstroth. (2020). Monitoring of free-ranging and captive *Psittacula* populations in Western Europe for avian bornaviruses, circoviruses and polyomaviruses. *Avian Pathol.* 49(2): 119-130.
5. Ko JCK, Choi YWY, Poon ESK, Wyre N and SYW Sin. (2024). Prevalence, genotypes, and infection risk factors of psittacine beak and feather disease virus and budgerigar fledgling disease virus in captive birds in Hong Kong. *Arch. Virol.* 169(5): 91.
6. Martens JM, Stokes HS, Berg ML, Walder K and ATD Bennett. (2020). Seasonal fluctuation of beak and feather disease virus (BFDV) infection in wild Crimson Rosellas (*Platycercus elegans*). *Sci. Rep.* 10(1): 7894.
7. Molini U, De Villiers M, De Villiers L, Coetzee LM, Hoebes E, Khaiseb S, Cattoli G, Dundon WG and G Franzo. (2023). Investigation and sequence analysis of psittacine beak and feather disease virus and avian polyomavirus from companion birds in Windhoek, Namibia. *Acta Trop.* 238: 106739.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI IBDV IN ITALIA: COMPARSA DI CEPPI RIASSORTANTI A3B1 NORD OCCIDENTALI E CO-CIRCOLAZIONE CON CEPPI AUTOCTONI

Poletto F.¹, Lizzi G.², Legnardi M.¹, Lupini C.², Tucciarone C.M.¹, Franzo G.¹, Pedrazzoli S.², Quaglia G.², Graziosi G.², De Nardi M.², Catelli E.², Cecchinato M.¹

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

²*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Università di Bologna, via Tolara di Sopra, 50, Ozzano dell'Emilia 40064, Italia*

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is a highly contagious and economically significant immunosuppressive pathogen affecting young chickens. Despite belonging to a single serotype, virulent IBDVs exhibit remarkable genetic and functional heterogeneity. Traditionally, strains have been categorised as classical, variant or very virulent, but many atypical IBDVs have recently been identified. One notable example is the emergence of North-Western European (NW EU) reassortants, belonging to genotype A3B1, which were first identified in 2017 and rapidly became predominant in most of the European continent. Until recently, Italy was a notable exception, as the circulating IBDVs there belonged to a separate A3B1 clade related to Russian and Middle Eastern strains. However, this study provides a thorough overview of the epidemiological development of IBDV in Italy, tracing the spread of NW EU reassortants from when they were first detected in December 2023 until now. Between March 2023 and April 2025, a total of 360 bursal pools were collected from broiler (n = 256) and pullet (n = 104) farms and analysed using molecular techniques. A total of 126 samples (35%) were positive for field strains (97 broiler, 29 pullet), 76 samples (21%) were positive for vaccine strains (43 broiler, 33 pullet) and 158 samples (44%) tested negative (116 broiler, 42 pullet). Notably, 59 (46.8%) of the field strains were NW EU reassortants (46 broiler, 13 pullet) while 65 strains (51.6%) belonged to the Italian Russian-Middle Eastern (ITA/RUS/ME) clade (50 broiler, 15 pullet). Two samples (1 broiler, 1 pullet) showed VP2 features consistent with the ITA/RUS/ME clade, but clustered with classical attenuated IBDVs at the VP1 level due to reassortment or co-infection between field and vaccine viruses. Following their initial detection, NW EU reassortants spread to all major poultry-producing regions, seemingly becoming more prevalent than the ITA/RUS/ME clade and causing an increase in infectious pressure. This rapid epidemiological shift highlights the threat posed by atypical IBDVs and the subsequent need for enhanced surveillance and control measures.

INTRODUZIONE

La bursite infettiva (IBD), nota anche come malattia di Gumboro, è una malattia virale altamente contagiosa che colpisce soprattutto i polli giovani tra le 2 e le 6 settimane di età, rappresentando una problematica significativa per l'industria avicola globale a causa delle sue ripercussioni economiche. IBD ha come principale bersaglio la borsa di Fabrizio, un organo linfatico primario che è responsabile del-

lo sviluppo e della maturazione dei linfociti B (Etteradossi & Saif, 2019). Durante la fase acuta della malattia, gli animali colpiti mostrano sintomi aspecifici come depressione, piumaggio arruffato, anoressia, disidratazione, a cui si accompagnano lesioni a carico della borsa ed emorragie a livello di muscoli delle cosce e del petto. Un'altra conseguenza importante di IBD è l'immunosoppressione, che rende i soggetti infetti più esposti a infezioni secondarie, riduce le performance produttive e compromette l'efficacia dei vaccini (Etteradossi & Saif, 2019). L'agente eziologico, noto come virus della bursite infettiva (IBDV), appartiene alla specie *Avibirnavirus gumboroense*, all'interno del genere *Avibirnavirus* e della famiglia *Birnaviridae*. Il suo genoma è costituito da un doppio filamento di RNA ed è suddiviso in due segmenti, A e B. Il segmento A codifica diverse proteine, tra cui la proteina del capsido (VP2), una proteina *scaffold* (VP3), una proteasi (VP4) e una proteina non strutturale (VP5), mentre il segmento B codifica la RNA polimerasi RNA-dipendente (VP1) (Zhang et al., 2022). IBDV è classificato in due sierotipi: il sierotipo 1, patogeno, e il sierotipo 2, avirulento. Tradizionalmente, i ceppi appartenenti al sierotipo 1 sono ulteriormente suddivisi in tre sottogruppi principali: i ceppi classici, descritti per la prima volta negli anni '60 (Cosgrove, 1962), associati a sintomi e lesioni tipiche; i ceppi varianti, che presentano significative differenze antigeniche e sono spesso legati a infezioni subcliniche; e i ceppi *very virulent* che, pur essendo antigenicamente simili ai ceppi classici, causano focolai più gravi e con mortalità più elevata (Etteradossi & Saif, 2019). Analogamente ad altri virus a RNA, la deriva antigenica e l'elevato tasso di mutazione complicano la prevenzione e il controllo di IBDV (Zhang et al., 2022). In particolare, mutazioni puntiformi nella regione ipervariabile di VP2 possono modificare i siti antigenici, consentendo l'evasione immunitaria e riducendo l'efficacia vaccinale (Jackwood & Sommer-Wagner, 2007). Inoltre, la possibilità di riassortimento genetico tra i segmenti genomici contribuisce all'evoluzione virale, portando all'emergere di molteplici sottotipi non pienamente rappresentati dalle classificazioni tradizionali. Negli ultimi anni, i sistemi di classificazione basati sulla filogenesi hanno fornito una comprensione più precisa dell'epidemiologia di IBDV. Tra i metodi disponibili, il sistema proposto da Islam et al. (2021) ha inizialmente identificato nove genogruppi (A0–A8) a livello di VP2 e cinque (B1–B5) a livello di VP1. Un ulteriore genotipo VP2 (A9) è stato successivamente descritto da Legnardi et al. (2022), portando a dieci il numero totale di genogruppi VP2. Combinando questi genogruppi si ottiene una classificazione composta in genotipi (es. A1B1, A1B2, A2B1, ecc.). Attualmente sono riconosciuti diciassette diversi genotipi, inclusa l'aggiunta successiva di riassortanti A2B3 da parte di Wang et al. (2021). L'enfasi su VP2 e VP1 deriva dalla loro importanza funzionale: VP2 gioca un ruolo chiave nella determinazione dell'antigenicità (Letzel et al., 2007), mentre sia VP2 che VP1 contribuiscono alla patogenicità (Escaffre et al., 2013). Considerare entrambi i geni, situati su segmenti genomici differenti, facilita anche l'individuazione di eventuali eventi di riassortimento (Mató et al., 2020; He et al., 2016). In Europa, tali approcci filogenetici hanno aiutato a rilevare un importante cambiamento epidemiologico che ha coinvolto i cosiddetti riassortanti dell'Europa nord-occidentale (NW EU). Dal loro primo rilevamento nel 2017 (Mató et al., 2020), questi ceppi, originati da un evento di riassortimento tra ceppi attenuati classici e ceppi *very virulent* e appartenenti quindi al genotipo A3B1, sono stati rilevati in molti

paesi europei, spesso come varianti predominanti (Legnardi et al., 2023; Mató et al., 2022; Pikuła et al., 2023; Reddy et al., 2024). Sebbene le ragioni della loro rapida diffusione restino poco chiare, essi sono stati associati sia sperimentalmente sia sul campo a infezioni subcliniche, difficili da diagnosticare basandosi solo sui segni clinici. Tuttavia, il loro consolidato potenziale immunosoppressivo richiede un aumento della sorveglianza e strategie di controllo adattive per mitigarne l'impatto (Mató et al., 2020). Nel contesto epidemiologico recente dell'Europa occidentale, l'Italia si è distinta per l'apparente assenza di tali riassortanti NW EU. Al contrario, il paese è stato interessato dalla circolazione di un distinto clade di IBDV A3B1 che, pur non essendo stato riscontrato in altri paesi europei, è stato segnalato in Russia, Kazakistan e in diversi paesi del Medio Oriente (Michel & Jackwood, 2017; Legnardi et al., 2023, 2024a). Le ragioni alla base della differente distribuzione dei riassortanti NW EU e del clade italo-russo-medorientale (ITA/RUS/ME) non sono ancora chiare, ma meritano ulteriori indagini. Il presente studio epidemiologico, condotto nell'arco di due anni nei settori del pollo da carne e della gallina ovaiole in Italia, ha permesso di documentare l'introduzione e la successiva diffusione dei ceppi riassortanti NW EU nel paese, nonché le dinamiche risultanti dalla co-circolazione con il clade A3B1 locale.

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni

Il presente studio si basa sui risultati diagnostici ottenuti da campioni raccolti nell'ambito di attività di monitoraggio routinario effettuati in allevamenti italiani di polli da carne e galline ovaiole nel periodo compreso tra marzo 2023 e aprile 2025. È stata adottata una strategia di campionamento di convenienza, poiché la raccolta dei campioni è avvenuta in base alla disponibilità delle aziende private. In totale, sono stati considerati 282 allevamenti, di cui 256 allevamenti di broiler, appartenenti a diverse filiere, oltre a 26 allevamenti di pollastre. In ogni azienda è stato raccolto un campione costituito da pool di borse di Fabrizio, conferite tal quale o impresse su FTA™ card (GE Healthcare UK Limited, Amersham, Regno Unito).

Gli allevamenti di broiler erano situati nelle seguenti regioni italiane: Emilia-Romagna (99), Veneto (75), Marche (37), Lombardia (21), Umbria (11), Lazio (11) e Piemonte (2). L'età dei polli al momento del campionamento era compresa tra 18 e 59 giorni (35,4 giorni in media). Di tutti gli allevamenti campionati, 157 erano stati vaccinati con vaccini vettorizzati, 35 con vaccini a immunocomplessi, 3 con vaccini vivi, 1 gruppo era stato immunizzato sia con vaccini vettorizzati che vivi e 3 non erano stati vaccinati. Non erano disponibili informazioni sul protocollo di vaccinazione applicato nelle restanti 57 aziende. I risultati clinici sono stati riportati per 112 allevamenti su 256: le principali manifestazioni cliniche registrate sono state enterite, zoppia, piume arruffate, deformità e colibacillosi, oltre a problemi aspecifici come scarso aumento di peso. Nei restanti 144 allevamenti non sono stati riscontrati sintomi o non sono state fornite informazioni sulla sintomatologia.

Nel comparto delle pollastre, sono stati raccolti 104 campioni tra aprile 2024 e aprile 2025 da 26 allevamenti, situati in Veneto (13), Emilia-Romagna (7), Lombardia (5) e Piemonte (1). I campioni sono stati prelevati in assenza di sospetti

clinici di Bursite Infettiva (IBD), da animali di età compresa tra 20 e 50 giorni (media: 34,7 giorni). Dallo stesso allevamento potevano essere prelevati più campioni in cicli diversi, o da capannoni differenti nello stesso giorno.

Processazione dei campioni ed estrazione degli acidi nucleici

Le analisi molecolari sono state effettuate presso il Laboratorio di Biotecnologie e Malattie Infettive del Dipartimento MAPS dell'Università di Padova (Legnaro) e il Laboratorio di Biologia Molecolare del Servizio di Patologia Aviarica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna (Ozzano dell'Emilia). Le impronte di borsa su FTA™ card sono state trattate eluendo frammenti di 5 mm² prelevati da ciascuna impronta in 1,0 ml di 1× PBS, mentre gli organi sono stati eluiti in 3,0 ml di 1× PBS. I campioni sono stati vortexati e gli acidi nucleici sono stati estratti utilizzando il kit di estrazione degli acidi nucleici High Pure (Roche, Basilea, Svizzera), seguendo le istruzioni del produttore. Gli eluati dei campioni e gli acidi nucleici estratti sono stati conservati a -80°C per tutta la durata dello studio.

Analisi molecolari

Le analisi molecolari dei geni VP2 e VP1 sono state eseguite utilizzando il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, Waltham, MA, USA). I primer 743-1 (5'-GCCAGAGTCTACAC-CAT-3') e 743-2 (5'-CCCGGATTATGTCTGA-3') (Jackwood & Sommer-Wagner, 2005) sono stati utilizzati per il sequenziamento della regione ipervariabile del gene, e i primer B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTATGAGACCGA-3') e B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') (Islam et al., 2012) per il sequenziamento parziale della VP1. La RT-PCR per l'amplificazione della VP1 è stata eseguita solo sui campioni positivi per ceppi di campo secondo le analisi preliminari. I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger presso il MacroGen Europe Milan Genome Center (Milano), utilizzando entrambi i primer impiegati nella rispettiva RT-PCR. I cromatogrammi sono stati controllati e trimmati con il software FinchTV (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA), assemblando poi la sequenza consenso con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD, Australia).

Analisi filogenetiche

Due dataset, uno per ciascun segmento, sono stati creati aggiungendo le sequenze ottenute a ceppi di riferimento rappresentativi di tutti i genogruppi noti secondo la classificazione di Islam et al. (2021). Le sequenze sono state allineate con l'algoritmo MUSCLE utilizzando MEGA 12 (Kumar et al., 2024), quindi gli alberi filogenetici sono stati generati utilizzando l'approccio di *Maximum Likelihood* con *bootstrapping* adattivo (soglia del 5,0%) e applicando il modello di sostituzione con il punteggio più basso in termini di *Bayesian Information Criterion* (BIC). Gli alberi risultanti sono stati esportati in formato Newick e modificati utilizzando il tool online Interactive Tree Of Life (ITOL) (Letunic & Bork, 2021).

RISULTATI

L'analisi molecolare condotta su campioni raccolti tra il 2023 e il 2025 ha permesso di aggiornare il quadro epidemiologico relativo alla circolazione dei virus della

bursite infettiva (IBDV) nel territorio nazionale. Per il comparto broiler, su un totale di 256 campioni, 97 (38%) sono risultati positivi a ceppi di campo, 43 (17%) a ceppi vaccinali, mentre 116 (45%) sono risultati negativi. I ceppi di campo sono stati rilevati in soggetti di età compresa tra 27 e 54 giorni (media: 37,2 giorni), quelli vaccinali tra 24 e 49 giorni (media: 34,7 giorni), mentre i gruppi negativi avevano un'età compresa tra 18 e 59 giorni (media: 34,1 giorni). Sulla base dell'analisi filogenetica, tutti i ceppi di campo identificati sono stati classificati come appartenenti al genotipo A3B1 e suddivisi in due principali gruppi: 46 (47%) erano riconducibili ai riassortanti NW EU e 50 (52%) appartenevano al clade ITA/RUS/ME (Figura 1). Un'eccezione era rappresentata dal campione B019, che mostrava caratteristiche del gene VP2 compatibili con la clade ITA/RUS/ME, ma una VP1 compatibile con il vaccino a immunocomplessi somministrato, suggerendo una coinfezione o un evento di riassortimento. La prima identificazione di un ceppo NW EU è avvenuta in Emilia-Romagna nel dicembre 2023 (Poletto et al., 2024). In seguito, questi ceppi si sono diffusi in Emilia-Romagna (12), Lombardia (10), Umbria (1) e soprattutto in Veneto (23). Il clade ITA/RUS/ME, invece, è stato rilevato lungo l'intero arco dello studio in Emilia-Romagna (31), Lazio (1), Lombardia (2), Marche (2), Piemonte (1) e Veneto (14). Le analisi hanno inoltre evidenziato una distribuzione eterogenea dei risultati in funzione del protocollo vaccinale: dei tre allevamenti non vaccinati, due sono risultati negativi e uno positivo a un ceppo di campo. Tutti e tre gli allevamenti vaccinati con un vaccino vivo sono risultati positivi ai ceppi di campo, mentre l'allevamento vaccinato con una combinazione di vaccini vettorizzati e vivi è risultato negativo. Tra le 35 aziende vaccinate con vaccini a immunocomplessi, 10 sono risultate negative, 14 positive a ceppi vaccinali e 11 positive a ceppi di campo. Anche i 157 allevamenti vaccinati con vaccini vettorizzati hanno mostrato risultati diversi: 75 sono risultate negative, 10 positive a ceppi vaccinali e 72 positive a ceppi di campo.

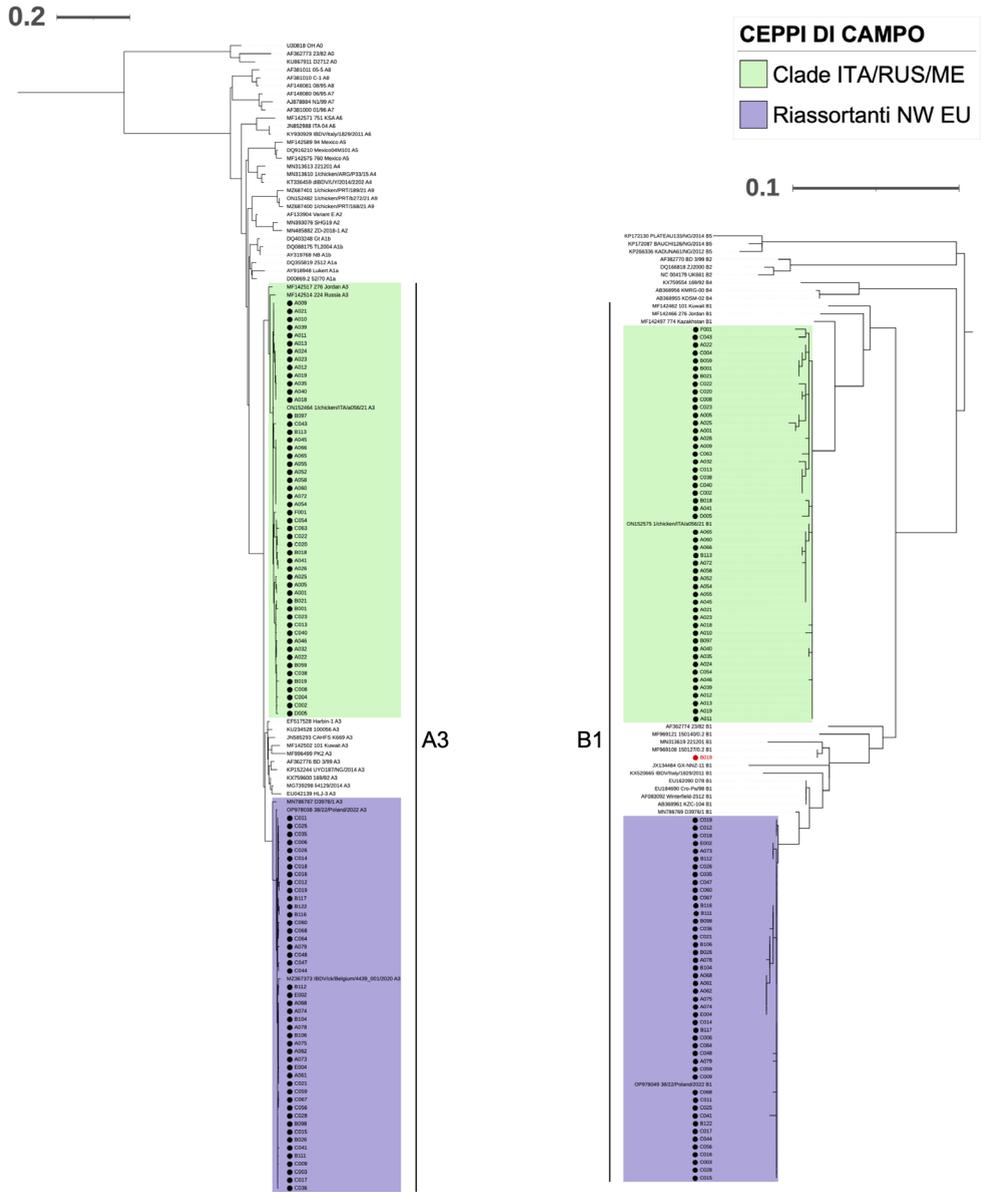
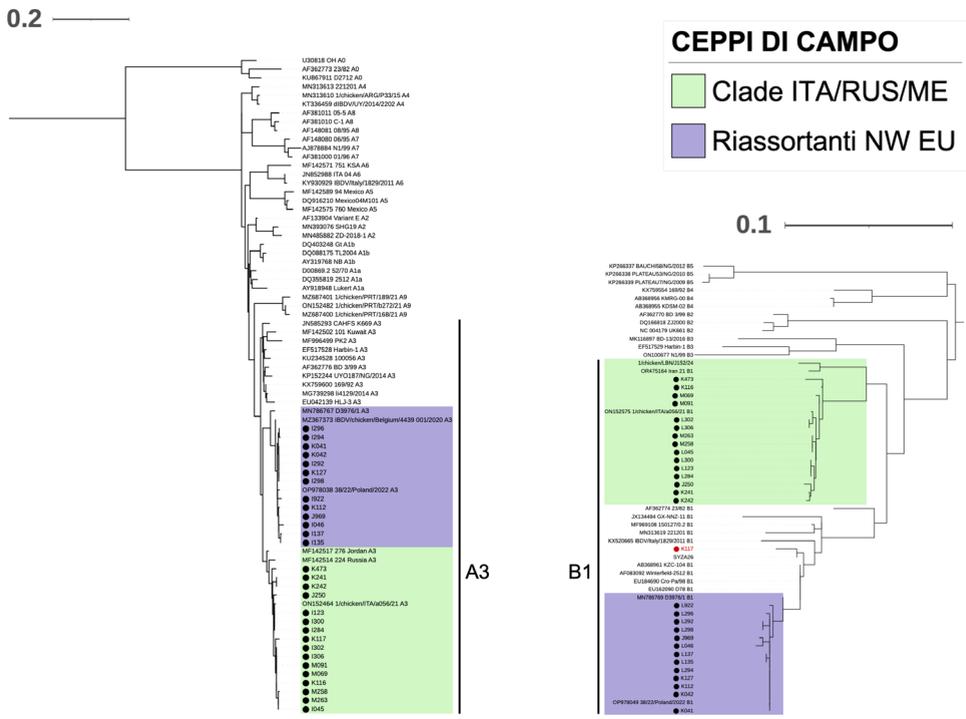


Figura 1. Alberi filogenetici che mostrano le relazioni tra i virus di campo individuati negli allevamenti di broiler (evidenziati con un simbolo circolare, ●) e le sequenze rappresentative dei genogruppi individuati da Islam et al. (2021) a livello di segmento A e segmento B.

Per il settore della gallina ovaioia, su 104 campioni analizzati tra aprile 2024 e aprile 2025 sono state rilevate 29 positività per ceppi di campo (27,9%), 33 positività per ceppi vaccinali (31,7%) e 42 negatività (40,4%). Tutti i ceppi di campo presentavano una VP2 di tipo *very virulent* e una VP1 *classical-like*, riconducibili al genotipo A3B1. Le analisi filogenetiche li hanno suddivisi in: 13 ceppi riassortanti NW EU e 15 appartenenti alla clade ITA/RUS/ME (Figura 2). Una singola eccezione era rappresentata dal campione K117, che mostrava una VP2 compatibile con la clade ITA/RUS/ME, ma una VP1 altamente simile al ceppo vaccinale somministrato. La presenza di doppi picchi nel cromatogramma ha suggerito una coinfezione con virus vaccinale e virus di campo. Il primo ceppo NW EU è stato rilevato a maggio 2024 in provincia di Verona, seguito da ulteriori casi in Veneto (5 allevamenti), Emilia-Romagna (2) e Piemonte (1). I ceppi ITA/RUS/ME sono stati invece identificati lungo tutto il periodo di indagine in Veneto (6), Emilia-Romagna (2) e Lombardia (1). Le infezioni da ceppi di campo sono state riscontrate in animali di età compresa tra 26 e 43 giorni. È interessante notare che non sono mai state rilevate coinfezioni contemporanee da NW EU e ITA/RUS/ME all'interno dello stesso allevamento. Tuttavia, in due allevamenti è stata documentata una sostituzione tra le due tipologie di ceppi di campo in cicli diversi, mentre altri due hanno mostrato persistenza dello stesso tipo di ceppo di campo in cicli successivi.



Considerando i risultati relativi ai due comparti produttivi indagati, entrambe le tipologie di ceppi di campo si sono rivelate largamente diffuse nelle principali province a vocazione avicola in Italia, con areali perlopiù sovrapponibili (Figura 3).

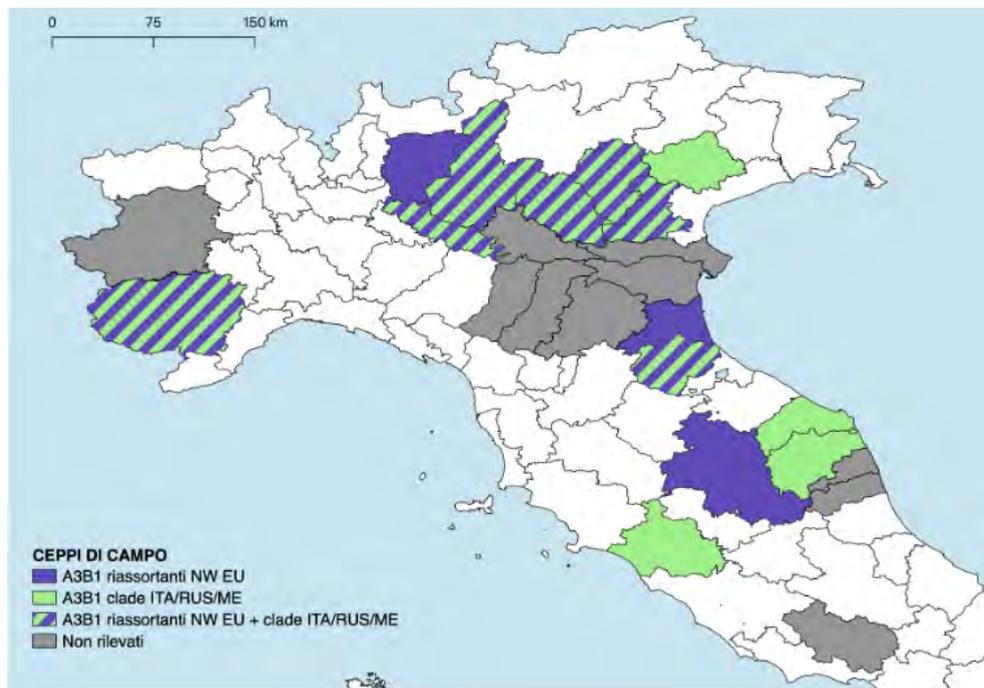


Figura 3. Distribuzione dei ritrovamenti di ceppi di campo a livello provinciale.

DISCUSSIONE

L'indagine condotta ha evidenziato una situazione epidemiologica in rapida evoluzione, con la co-circolazione di ceppi appartenenti al clade ITA/RUS/ME e di ceppi riassortanti NW EU. Il primo rilevamento di questi ultimi è avvenuto nel dicembre 2023 nel comparto del pollo da carne, mentre l'apparente introduzione in quello della gallina ovaiole risale al maggio 2024, rivelando una rapida espansione virale intersettoriale a discapito della acclarata segregazione produttiva (Franzo et al., 2020). L'ingresso dei ceppi riassortanti NW EU in Italia è avvenuto più tardi rispetto ad altri Paesi europei ma ha rapidamente portato ad un incremento della pressione infettiva e della prevalenza nei campioni di campo, con un tasso di rilevamento salito dal 26,7% al 37,8% dopo il dicembre 2023 (Legnardi et al., 2023; Poletto et al., 2024). Sebbene una vera analisi di prevalenza non sia possibile a causa del ricorso a un campionamento di convenienza, questi risultati suggeriscono la superiore fitness epidemiologica dei riassortanti NW EU e la loro capacità di sostituire rapidamente altri ceppi circolanti, come già osservato in altri contesti geografici (Legnardi et al., 2024b). Ciononostante, il clade ITA/RUS/ME, presente in Italia almeno dal 2013-2014, continua a circolare in parallelo nei medesimi areali già raggiunti dai riassortanti NW EU.

Alla luce del loro frequente ritrovamento in assenza di rilievi clinici degni di nota, entrambe le tipologie dei ceppi di campo rilevate sembrano avere natura subclinica, sebbene essa sia stata confermata sperimentalmente solo per i riassortanti NW EU (Mató et al., 2020). Dal punto di vista diagnostico e gestionale, ciò comporta numerose sfide: in sede di analisi molecolare, emerge infatti come sia importante considerare entrambi i segmenti genomici per una corretta caratterizzazione, nonché di condurre un monitoraggio routinario piuttosto che solo in caso di sospetti clinico. Anche la scelta del vaccino va tenuta in considerazione, in quanto può influenzare l'esito diagnostici: replicando a livello di borsa, i vaccini vivi e a immunocomplessi sono più facilmente rilevati rispetto a quelli vettorizzati (Ramon et al., 2022), anche se finora non sono state osservate differenze in termini di efficacia protettiva nei confronti dei ceppi di campo attualmente circolanti in Italia (Legnardi et al., 2024a).

CONCLUSIONI

Il presente studio fornisce un quadro aggiornato e approfondito della situazione epidemiologica dell'IBDV in Italia, evidenziando il recente ingresso e la rapida diffusione dei ceppi riassortanti NW EU sia nel settore del pollo da carne che in quello della gallina ovaioia, a cui sembra essere seguito un aumento della pressione infettiva. Queste evidenze sottolineano l'importanza di adottare strategie diagnostiche e di controllo basate su un monitoraggio molecolare costante e allineato con i criteri di classificazione più attuali, al fine di identificare tempestivamente eventuali ceppi di campo e contenerne la circolazione. Dati i documentati effetti immunosoppressivi associati a questa tipologia di ceppi, è fondamentale incrementare la vigilanza sanitaria per valutare il loro impatto potenziale su infezioni secondarie, performance produttive e salute generale del gruppo. In tal senso, i risultati dello studio rappresentano un importante strumento operativo e conoscitivo per migliorare la gestione della malattia, aumentando al contempo la consapevolezza sulle ripercussioni dell'immunosoppressione indotta da IBDV, problematica ad oggi ancora sottostimata sia a livello nazionale che internazionale.

BIBLIOGRAFIA

1. Cosgrove AS. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Dis.* 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. *J. Virol.* 87:2767–2780.
3. Etteradossi N. and YM Saif. (2019). Infectious bursal disease. In: *Diseases of Poultry (14th ed.)*, pp. 257-283.
4. 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.* 10:7289.
5. He X, Chen G, Yang L, Xuan J, Long H, and P Wei. (2016). Role of naturally occurring genome segment reassortment in the pathogenicity of IBDV field isolates in Three-Yellow chickens. *Avian Pathol.* 45:178–186.
6. Islam MR, Rahman S, Noor M, Chowdhury EH and HMüller. (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. *Arch. Virol.* 157:333-336.
7. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Eterradosi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathol.* 50:190-206.
 8. 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 Dis.* 49:220–226.
 9. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2007). Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virol.* 365:369-375.
 10. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S and K Tamura. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41:msae263.
 11. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Duarte I, Silva M, Le Tallec B and M Cecchinato. (2022). Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathol.* 51:97-105.
 12. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K and M Cecchinato. (2023). Infectious bursal disease virus in Western Europe: The rise of reassortant strains as the dominant field threat. *Avian Pathol.* 52:25-35.
 13. 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 Pathol.* 53:56-67.
 14. Legnardi M, Duarte I, Silva M, Poletto F, Tucciarone CM, Koutoulis KC 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 Congress – The Book of Abstracts*, p. 426.
 15. Letunic I and P Bork. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Res.* 49:W293–W296.
 16. 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. *J. Virol.* 81:12827–12835.
 17. Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K and V Palya. (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Vet. Microbiol.* 245:108663.
 18. Mató T, Medveczki A and I Kiss. (2022). Research Note: “Hidden” infectious bursal disease virus infections in Central Europe. *Poult. Sci.* 101:101958.
 19. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Arch. Virol.* 162:3661–3670.
 20. Piłkuła A, Lisowska A and K Domańska-Blicharz. (2023). Epidemiology of Infectious Bursal Disease Virus in Poland during 2016-2022. *Viruses* 15:289.
 21. Poletto F, Tonellato FR, Tucciarone CM, Franzo G, Broggi M, Pirota M, Falappa S, Ceroni S, Cecchinato M and M Legnardi. (2024). Identificazione e caratterizzazione molecolare di ceppi riassortanti dell’Europa nordoccidentale (Genotipo

- A3B1) in Italia. In *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA) 2024: LXIII Convegno Nazionale SIPA e IX Simposio Scientifico*. Pp. 83-89.
22. R Core Team. (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
 23. Ramon G, Legnardi M, Cecchinato M, Cazaban C, Tucciarone CM, Fiorentini L, Gambi L, Mato T, Berto G, Koutoulis K and G Franzo. (2022). Efficacy of live attenuated, vector and immune complex infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines in preventing field strain bursa colonization: A European multicentric study. *Front. Vet. Sci.* 9:978901.
 24. Reddy VR, Bianco C, Poulos C, Egana-Labrin SC, Brodrick AJ, Nazki S, Schock A and AJ Broadbent. (2024). Molecular characterization of reassortant infectious bursal disease virus (IBDV) strains of genogroup A3B1 detected in some areas of Britain between 2020 and 2021. *Virol.* 600:110269.
 25. Wang Y, Jiang N, Fan L, Niu X, Zhang W, Huang M, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Liu A, Pan Q, Zhang Y, Wang X and X Qi. (2021). Identification and Pathogenicity Evaluation of a Novel Reassortant Infectious Bursal Disease Virus (Genotype A2dB3). *Viruses* 13:1682.
 26. 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.

MICOPLASMOSI AVICOLE: DIECI ANNI DI ISOLAMENTI PER INDAGARE PERSISTENZA E TRASMISSIONE NEI DIVERSI SISTEMI PRODUTTIVI

Rinaldi E.¹, Gastaldelli M.¹, Tondo A.¹, Picchi M.¹, Colò B.¹, Prativiera D.¹, Giacomelli M.¹, Catania S.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Verona, Via Bovolino, 1, 37060 Buttapietra (VR), Italia.

Summary

A variety of *Mycoplasma* species can be isolated from poultry. Some of them are a well-known cause of disease and economic loss in the poultry industry, others are more commonly found in rural environments. The aim of this study was to compare the diversity of *Mycoplasma* species isolated and their distribution across different farming systems from 2013 to 2023, based on samples collected from chickens and turkeys submitted to the laboratories of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. The data analysis was performed distinguishing between industrial and rural farming systems, which differ in the presence (industrial) or absence (rural) of biosecurity measures, and further categorizing the data into chicken and turkey groups. Within industrial poultry farming, an additional distinction was made between multi-age systems, as seen in layer hens, and single-age systems, which were grouped together under the category of “chicken.” The greatest variety of *Mycoplasma* species was observed in rural farms, likely due to frequent contact with the external environment. A slightly lower but still significant species diversity was observed in layer hens. The multi-age farming system presents increased risks to biosecurity, particularly with regard to indirect horizontal transmission of infectious agents. Finally, despite strict controls aimed at preventing vertical transmission, as well as disinfection protocols and adherence to depopulation practices, more than 90% of the isolates from industrial poultry farming were *M. gallisepticum* and *M. synoviae*. It could be hypothesized that the ability of these two species to produce biofilm may contribute to their environmental survival and play a role in the epidemiology of the disease.

INTRODUZIONE

I micoplasmi sono batteri caratterizzati dall'assenza della parete cellulare e da un genoma di ridotte dimensioni che non consente loro di sintetizzare la totalità delle molecole necessarie alla replicazione. Per questo motivo sono microrganismi ospite-dipendenti e la coltivazione *in vitro* è resa indagine dai loro complessi requisiti nutrizionali. Ubiquitari in natura, sopravvivono sulle mucose del tratto respiratorio, urogenitale e congiuntivale, nel canale alimentare e a livello articolare dell'ospite infettato con malattia subclinica. Si trasmettono per via orizzontale, a partire da secrezioni infette e materiale contaminato, e per via verticale (Feburay e McVey, 2022).

Nel settore avicolo industriale, in particolare del pollo e del tacchino, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* e *M. iowae* rappresentano un problema di rilievo per tutte le categorie produttive. Nell'allevamento da carne

l'infezione può causare un minore incremento ponderale dei soggetti colpiti con formazione di scarti e declassamenti delle carcasse in fase di macellazione, mentre nel settore delle ovaiole e nei riproduttori si verifica una riduzione della produzione di uova e una minore percentuale di schiusa. *M. gallisepticum* e *M. meleagridis* sono inclusi nella categoria D+E del Regolamento di esecuzione (UE) 1882/2018, ossia sono malattie per le quali sono necessarie misure per evitarne la diffusione e che necessitano di sorveglianza. Non sono invece presenti, ad oggi, norme europee o nazionali per il controllo di *M. synoviae* e *M. iowae*, il cui monitoraggio dipende dalle singole filiere. La prevenzione e la gestione dell'infezione si basano principalmente sull'adozione di corrette misure di biosicurezza volte ad impedirne l'entrata e la diffusione in allevamento, ad esempio attraverso la pratica del "tutto pieno-tutto vuoto", sulla vaccinazione e sul garantire la negatività dei riproduttori, attraverso il monitoraggio sierologico o biomolecolare (Ferguson-Noel et al., 2019).

La presenza di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* è stata dimostrata anche in oche, fagiani, pernici, falchi, poiane, passeri domestici e molte altre specie aviarie. Uno studio sulla prevalenza di *Mycoplasma* spp. in varie specie di uccelli selvatici con diverse caratteristiche di alimentazione, habitat e pattern migratori non ha invece dimostrato la presenza dei microrganismi. Sulla base di questi riscontri si potrebbe ipotizzare una bassa prevalenza nel *reservoir* selvatico, e di conseguenza un rischio ridotto di trasmissione dell'infezione agli avicoli domestici (Michielis et al., 2016; Sawicka-Durkalec et al. 2021). Al contrario, specie non patogene tipicamente ritrovate nei volatili selvatici appartenenti alla famiglia dei Galliformes, quali *M. imitans*, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum* e *M. pullorum*, sono state isolate anche nei domestici, talvolta casualmente, come contaminanti di campioni effettuati al fine della ricerca di micoplasmi patogeni.

Al di fuori del *reservoir* la resistenza dei micoplasmi è bassa: persistono in ambienti umidi e freschi, mentre sono suscettibili al caldo e ai principali detergenti e disinfettanti (ammonio quaternario, iodio e composti a base di fenolo). *M. gallisepticum* e *M. synoviae* sono stati identificati attraverso isolamento e PCR su campioni ambientali quali piume, polvere, mangime, acqua d'abbeverata e deiezioni (Ferguson-Noel et al., 2019). Mostrano resistenza intrinseca ad antibiotici quali rifampicina, polimixine, sulfonamidi, chinoloni di prima generazione e al trimethoprim, e a molecole che hanno come bersaglio la sintesi della parete cellulare. Risultano invece sensibili a tetracicline, macrolidi, fluorochinoloni e pleuromutiline (Gauthier-Bouchardon, 2018). Recentemente è stata dimostrata la capacità di alcune specie di *Mycoplasma* di produrre biofilm *in vitro*, caratteristica che potrebbe permetterne la sopravvivenza nell'ambiente esterno. Nello studio menzionato più del 90% dei ceppi di *M. gallisepticum* e dell'85% dei ceppi di *M. synoviae* e *M. meleagridis* analizzati hanno formato biofilm in 28 giorni, contro percentuali ben minori (dal 14% al 47%) rilevate in *M. gallinaceum*, *M. gallinarum*, *M. iners* e *M. pullorum*, da parte dei quali la produzione di biofilm è avvenuta più lentamente. Non è stata invece rilevata alcuna produzione di biofilm da parte del ceppo di *M. iowae* (Catania et al., 2024).

MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono stati analizzati i dati ottenuti nel periodo 2013-2023 me-

dianche analisi volte all'isolamento di micoplasmi da campioni prelevati sul territorio nazionale dalle specie *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo*, effettuate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, sede di Verona. I campioni sono stati prelevati da diverse matrici organiche: trachea, cloaca, ovidutto, articolazione, uova e guscio, sacco vitellino, polmone e sacchi aerei, esofago e intestino, rene, pericardio, midollo osseo, cervello, occhio e palpebra, milza, seno nasale e seno infraorbitale, borsa sternale, piume, polvere e tamponi ambientali. La procedura di isolamento è stata svolta secondo le indicazioni riportate dal Manuale WOA, capitolo 3.3.5. L'identificazione di specie di *Mycoplasma* spp. è stata effettuata mediante amplificazione della regione variabile del gene V3 nel DNA ribosomiale 16S (rDNA) e successiva corsa elettroforetica su gradiente denaturante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE) (McAuliffe et al., 2005).

Gli isolati ottenuti sono stati classificati in base all'anno di isolamento, alla specie di origine (*Gallus gallus* o *Meleagris gallopavo*), alla tipologia di allevamento (industriale o rurale), all'esito dell'isolamento (positivo, negativo, inquinato) e, in caso di positività, alla specie di micoplasma isolata. Per gli isolati da allevamenti industriali della specie *Gallus gallus* è stata effettuata un'ulteriore suddivisione nelle categorie "pollo" e "gallina ovaioia" prendendo in considerazione l'esecuzione del "tutto pieno-tutto vuoto" applicata all'intero allevamento, come avviene nei polli riproduttori e da ingrasso, o a livello del singolo capannone, come si trova più frequentemente nell'allevamento della gallina ovaioia. In questo modo è stata effettuata una distinzione tra gli allevamenti costituiti da soggetti della stessa età (pollo) e quelli "multietà" (gallina ovaioia).

RISULTATI

Sono state effettuate in totale 6.469 procedure d'isolamento per *Mycoplasma* spp., il 30,7% delle quali ha dato esito positivo, il 68,5% esito negativo e lo 0,8% inconclusivo per contaminazione. Dei campioni positivi, il 74% proviene da allevamenti industriali mentre il 26% da allevamenti rurali. Nella Tabella 1 sono riportati il numero di analisi eseguite, quelle con esito positivo e il numero di isolati ottenuti con relativa distribuzione nelle specie avicole, classificate per tipologia di allevamento e, nell'allevamento industriale, anche per categoria produttiva.

Allevamenti industriali

Nell'intervallo considerato sono state eseguite 4.817 procedure di isolamento, il 47,2% delle quali dalla categoria pollo, il 21,5% dalla gallina ovaioia e il 31,3% dal tacchino. Mettendo in relazione il numero di analisi risultate positive sul totale dei campioni effettuati in ciascuna categoria avicola considerata, si osserva una maggiore proporzione di positivi nei campioni provenienti dal settore gallina ovaioia (41%), leggermente più bassa in quelli appartenenti alla categoria pollo (35%) e appena il 13% nel tacchino. Anche il numero di coinfezioni, cioè l'isolamento di due o più specie di micoplasma dallo stesso campione, è maggiore nell'ovaioia rispetto alle altre due categorie considerate. Infatti, in questo settore la percentuale delle coinfezioni calcolata sul totale dei campionamenti risultati positivi è del 22%, notevolmente superiore a quella riscontrata nel pollo e nel tacchino, rispettivamente pari al 4% e 0,3%.

Le specie di *Mycoplasma* spp. più frequentemente isolate sono *M. synoviae* (1.073 isolamenti) e *M. gallisepticum* (233 isolamenti), e in numero minore ma comunque degno di nota *M. gallinarum* (129 isolamenti) e *M. iners* (58 isolamenti).

Prendendo in considerazione la distribuzione delle specie di *Mycoplasma* nelle singole categorie produttive, si osserva una maggiore proporzione di isolamenti per *M. synoviae* e *M. gallisepticum* e sia nel pollo, sia nel tacchino. Nel pollo la specie isolata più frequentemente è *M. synoviae* (81%), seguito da *M. gallisepticum* (14%), mentre il restante 5% degli isolati comprende specie non patogene quali *M. iners*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. glychophilum*, *M. pullorum* e *M. gallopavo*. Un quadro simile si osserva nel tacchino, nel quale il 60% degli isolati è stato identificato come *M. synoviae*, il 32% come *M. gallisepticum* e il 7% come *M. iowae*, seguiti da un solo isolato di *M. gallopavonis*.

Il quadro nella gallina ovaioia si discosta dai precedenti, seppure *M. synoviae* risulti comunque essere la specie più frequentemente isolata (56%), seguita da *M. gallinarum* (21%), *M. gallisepticum* (11%) e *M. iners* (8%). La restante percentuale di isolamenti (4%) comprende le specie *M. gallinaceum*, *M. glychophilum*, *M. pullorum* e *M. verecundum*. Come riportato precedentemente, in questo settore si è riscontrata un'elevata percentuale di campioni coinfecti, nei quali le specie maggiormente rappresentate sono *M. synoviae* e *M. gallinarum* (rispettivamente nel 35% e 30% dei casi) seguiti da *M. iners* (16%) e *M. gallisepticum* (14%). Le restanti specie isolate in coinfezione sono *M. gallinaceum*, *M. glychophilum* e *M. pullorum*.

Allevamenti rurali

Nell'effettuare l'analisi dei dati derivati dal campionamento in allevamenti rurali non sono state fatte distinzioni di indirizzo produttivo. Si tratta infatti di contesti famigliari in cui gli animali vengono allevati per l'autoconsumo (carne, uova) e generalmente vivono negli stessi ambienti senza separazione in base a età, sesso o specie.

I dati ottenuti sono stati quindi classificati distinguendo le due specie, *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo*, identificate in questo studio come "pollo" e "tacchino". Sono stati analizzati 1.652 campioni, dei quali l'85% proveniente dal gruppo pollo e il 15% dal tacchino. Di questi, sono risultati positivi rispettivamente il 39% e il 22%.

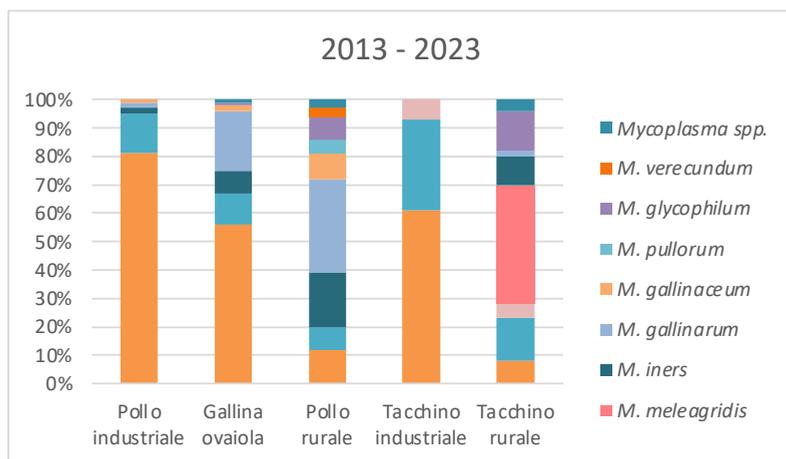
Relativamente alla specie *Gallus gallus*, nel 21% dei campioni risultati positivi sono state isolate due o più specie di *Mycoplasma*: su un totale di 546 analisi effettuate si sono ottenuti 769 isolamenti. *M. gallinarum* rappresenta il 33% degli isolati, seguito da *M. iners* (19%), *M. synoviae* (12%), *M. gallinaceum* (9,2%) e *M. glychophilum* (8,2%), *M. gallisepticum* (8%), *M. pullorum* (5,2%), *M. verecundum* (3,4%) e *M. columborale* (1%). Nel restante 1% dei casi di positività non è stato possibile identificare con certezza la specie di *Mycoplasma* spp. isolata.

Nel tacchino gli isolamenti sono stati in totale 59, con la presenza di 4 campioni coinfecti. La specie isolata più frequentemente, nel 42% dei casi, è *M. meleagridis*, mentre in percentuale minore osserviamo *M. gallisepticum* (15%), *M. glychophilum* (14%), *M. iners* (10%), *M. synoviae* (8%), *M. iowae* (5%), *M. gallinarum* (2%), *M. verecundum* (2%) e *M. cloacale* (2%).

Tabella 1. Tabella riassuntiva con il numero di analisi per l'isolamento di *Mycoplasma* spp. effettuate, numero delle analisi risultate positive, numero di isolati ottenuti in totale e suddivisi per specie di *Mycoplasma* spp., distinti in base alla specie avicola, alla tipologia di allevamento e, nell'allevamento industriale, alla categoria produttiva.

	Allevamenti industriali			Allevamenti rurali	
	Pollo	Gallina ovaiola	Tacchino	Pollo	Tacchino
n° procedure di isolamento eseguite	2272	1039	1510	1401	251
n° procedure di isolamento positive	786	421	192	546	55
n° isolati	815	529	193	769	59
<i>M. gallisepticum</i>	112	59	62	63	9
<i>M. synoviae</i>	659	297	117	91	5
<i>M. iowae</i>	0	0	13	0	3
<i>M. meleagridis</i>	0	0	0	0	25
<i>M. iners</i>	14	43	0	144	6
<i>M. gallinarum</i>	17	112	0	251	1
<i>M. gallinaceum</i>	7	12	0	71	0
<i>M. pullorum</i>	1	2	0	40	0
<i>M. glycyphilum</i>	3	3	0	65	8
<i>M. verecundum</i>	0	1	0	26	0
<i>M. gallopavonis</i>	1	0	1	0	1
<i>M. columborale</i>	0	0	0	7	0
<i>M. cloacale</i>	0	0	0	1	0
<i>Mycoplasma</i> spp.	1	0	0	10	1

Figura 1. Distribuzione delle specie di *Mycoplasma* isolate nel periodo 2013-2023 per specie avicola, tipologia di allevamento e categoria produttiva.



DISCUSSIONE

L'analisi dei dati raccolti in questo studio ha permesso di evidenziare una differenza nella variabilità e distribuzione delle specie di *Mycoplasma* isolate dall'allevamento industriale rispetto a quello rurale.

Nell'allevamento industriale è emersa la netta preponderanza di *M. synoviae*, riscontrato nel 70% dei campioni positivi, seguito da *M. gallisepticum* in percentuale notevolmente minore (15%), e con ulteriore distacco da *M. gallinarum*, *M. iners* e *M. gallinaceum* nel pollo, mentre nel tacchino *M. iowae* è l'unica altra specie rilevata. È degno di nota il fatto che gli isolamenti relativi a *M. iowae* sono limitati agli anni 2013 e 2014, successivamente al riscontro di positività in alcuni gruppi di tacchini nel 2011, che riportavano sintomi di scarsa crescita e anomalo sviluppo e debolezza degli arti (Catania et al., 2012).

Nell'allevamento rurale la varietà di specie isolate è molto più ampia rispetto all'industriale, con ben 8 diverse specie riscontrate sia nel pollo che nel tacchino, e la preponderanza di *M. gallinarum* e *M. iners* in *Gallus gallus*, e di *M. meleagridis* in *Meleagris gallopavo*. Questa differenza può essere verosimilmente imputata in *primis* all'assenza, nell'allevamento rurale, di sistemi di biosicurezza che prevengano la trasmissione orizzontale di *Mycoplasma* spp. Tipicamente, infatti, in questo tipo di allevamento il livello di biosicurezza è basso o assente, e gli animali possono entrare in contatto facilmente con altri soggetti della stessa specie, domestici o selvatici; inoltre la provenienza dei nuovi arrivati non è controllata. Un altro riscontro interessante consiste nel fatto che, relativamente alla specie *Gallus gallus*, negli allevamenti rurali sono state isolate prevalentemente le specie non patogene che si ritrovano comunemente nei gallinacci, domestici e selvatici, quali *M. gallinarum*, *M. iners*, *M. gallinaceum* e *M. glycophilum*, e che possono essere trasmesse orizzontalmente per contatto. Al contrario le specie patogene, *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, non superano in totale il 20% degli isolamenti. La bassa percentuale di queste ultime nell'allevamento rurale potrebbe essere ricondotta ad una maggiore difficoltà nella colonizzazione del substrato tracheale, poiché già occupato dalle specie non patogene. Un'altra causa ipotizzabile è che nei contesti rurali venga posta meno attenzione alla diagnosi delle micoplasmosi, con conseguente minore sensibilità nella ricerca dei micoplasmi patogeni o, ancora, che soggetti non sottoposti alle condizioni di stress presenti nell'allevamento intensivo, siano meno predisposti all'insorgenza dell'infezione.

Al contrario, nell'allevamento industriale la presenza di sistemi di biosicurezza che impediscono il contatto tra i soggetti allevati e l'ambiente esterno riduce la possibilità che gli animali vengano infettati da micoplasmi per via orizzontale. Inoltre, data la rilevanza e l'impatto della trasmissione verticale, nel settore industriale esistono programmi di controllo e monitoraggio cogenti per *M. gallisepticum* e volontari per *M. synoviae* atti al mantenimento di riproduttori *Mycoplasma-free*. Per la sua importanza economica e l'inclusione nel regolamento (UE) 1882/2018 tra le malattie da sottoporre a sorveglianza, viene posta una particolare attenzione nei confronti di *M. gallisepticum*, il quale infatti è stato isolato molto meno frequentemente rispetto a *M. synoviae* sia nel pollo che nel tacchino. Una dinamica simile di *Mycoplasma* spp. tra pollo e tacchino è stata riscontrata anche nell'ambito rurale con l'isolamento dai tacchini di molteplici specie non patogene comuni ai galliformi. Risalta il rinvenimento di alcune positività a *M. meleagridis*, totalmente assente nel settore

industriale dove negli anni sono stati applicati piani per il risanamento dei riproduttori e dove viene effettuata sorveglianza, come per *M. gallisepticum*, secondo Regolamento europeo. Lo scarso o assente controllo sanitario dei soggetti di nuova introduzione negli allevamenti rurali potrebbe essere all'origine di questo dato. Confrontando invece i rilievi derivanti dall'allevamento industriale di polli e galline ovaiole, mentre la varietà delle specie isolate è paragonabile nelle due categorie produttive e in entrambi si osserva una maggiore percentuale di isolamenti per *Mycoplasma synoviae*, si evidenzia invece una distribuzione percentuale diversa delle altre specie individuate (*M. gallisepticum*, *M. gallinarum*, *M. iners*, *M. gallinaceum*). È interessante notare come nella gallina ovaiole la seconda specie maggiormente isolata sia un micoplasma non patogeno, *M. gallinarum* e, inoltre, anche *M. iners* è stato ritrovato in un alto numero di campioni, al quarto posto tra i micoplasmi più isolati, in percentuale solo leggermente inferiore rispetto a quella di *M. gallisepticum*. Nella gallina ovaiole l'esistenza di allevamenti multietà aumenta la probabilità che eventuali micoplasmi possano persistere in allevamento trasmettendosi per via orizzontale dai gruppi più vecchi a quelli di più recente accasamento. È infatti riportato in letteratura che gli allevamenti multietà rappresentano un fattore di rischio per l'introduzione e la trasmissione di *M. gallisepticum* e *M. synoviae* attraverso la diffusione di materiale contaminato (Bencina et al., 1987; Feberwee et al., 2022).

Attualmente, la sorveglianza verso *M. gallisepticum* regolamentata dall'UE e l'attenta gestione di *Mycoplasma synoviae* effettuata nei riproduttori riducono significativamente la probabilità di nuove infezioni per via verticale. Inoltre, l'adozione di adeguate tecniche di sanificazione e di rigorose misure di biosicurezza dovrebbe essere efficace nel prevenire la trasmissione orizzontale. Tuttavia, nonostante gli sforzi volti a mantenere gli allevamenti privi di micoplasmi, continuano a verificarsi focolai dei quali non è possibile determinare l'origine. Considerando che la sopravvivenza di tali microrganismi al di fuori dell'ospite è possibile su alcuni substrati organici ma generalmente di breve durata, e che la trasmissione da uccelli selvatici o rurali avviene solo tramite contatto diretto, si ipotizza il coinvolgimento di una terza modalità di persistenza ambientale, quale la formazione di biofilm. Infatti, come già precedentemente menzionato, alcuni ceppi di *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, hanno dimostrato in vitro una capacità notevolmente maggiore di produrre biofilm rispetto alle specie di *Mycoplasma* non patogene. Questo aspetto suggerisce che la capacità di formare biofilm potrebbe rappresentare un vantaggio per la loro sopravvivenza e persistenza nell'ambiente anche per tempi prolungati, come quelli previsti dal vuoto sanitario. Tuttavia, sebbene la formazione di biofilm anche da parte di altre specie patogene appartenenti al genere *Mycoplasma* sia documentata (McAuliffe et al., 2006; Simmons et al., 2013; Wu et al., 2022), le conoscenze attuali non permettono di determinare se questa capacità svolga un ruolo attivo nella trasmissione dell'infezione e quindi a tal fine saranno necessari ulteriori studi. Sarà altresì utile ricorrere a metodiche di genotipizzazione molecolare dei ceppi isolati per individuare possibili connessioni epidemiologiche tra ceppi identificati nell'allevamento industriale e rurale, e nel selvatico. Uno studio di tipizzazione di *M. iowae* attraverso MLVA (*Multiple-Locus Variable number of tandem-repeats Analysis*) e cgMLST (*core genome Multi-Locus Sequence Typing*) ha rilevato una diversa origine dei ceppi circolanti nella selvaggina rispetto a quel-

li osservati nel tacchino durante l'ondata epidemica tra il 2012 e 2014 in Italia. Ciò ha permesso di ipotizzare l'esistenza di genotipi specie-specifici o una scarsa capacità di trasmissione per via orizzontale di *M. iowae* (Buni et al., 2023). Al contrario, l'applicazione della metodica MLST su isolati di *M. gallisepticum* ottenuti da campioni effettuati nel Nord Italia, ha fatto supporre un possibile ruolo del reservoir rurale e selvatico nell'introduzione di determinati ceppi all'interno dell'allevamento industriale (Matucci et al., 2020). Ulteriori studi svolti tramite metodi di genotipizzazione applicati sia a *M. gallisepticum* che a *M. synoviae*, risulterebbero estremamente utili nel cercare di delucidare le vie di trasmissione dei micoplasmi.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio mostrano differenze interessanti nella variabilità e distribuzione delle specie di *Mycoplasma* nei diversi sistemi di allevamento. Negli allevamenti rurali si registra la maggior variabilità, verosimilmente a causa della parziale o mancata applicazione di misure di profilassi e controllo sulla trasmissione verticale e orizzontale. Si osserva infatti nel tacchino la presenza di *M. meleagridis*, mai isolato all'interno dell'allevamento industriale, e di *M. iowae* nel 2022, il cui ultimo isolamento nell'industriale risale al 2014. Nel pollo invece le specie più rappresentate, dopo *M. synoviae*, sono quelle non patogene, molto probabilmente per l'elevata possibilità per questi soggetti di entrare in contatto con l'ambiente esterno e i selvatici, possibili reservoir. Negli allevamenti industriali, la principale differenza nella distribuzione delle specie di *Mycoplasma* si riscontra tra i sistemi che applicano il depopolamento totale seguito da un vuoto sanitario (come per polli e tacchini), e il settore delle galline ovaiole, caratterizzato dalla coesistenza in allevamento di gruppi di età diversa. Quest'ultimo modello presenta un rischio più elevato di trasmissione di patogeni all'interno dell'allevamento e spiega la maggiore varietà di specie isolate, tra le quali *M. gallinarum*, *M. iners* e *M. gallinaceum*, tutte comunemente trasmesse per via orizzontale. La presenza costante delle specie di maggiore rilevanza economica, *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, anche nelle tipologie di allevamento che applicano misure di controllo rigorose per impedire la trasmissione verticale e orizzontale di questi patogeni, potrebbe essere attribuita alla loro capacità più spiccata, rispetto alle specie non patogene, di formare biofilm. Tuttavia, ulteriori studi saranno necessari per determinare se questa caratteristica giochi effettivamente un ruolo epidemiologico rilevante nella diffusione dei micoplasmi.

BIBIOGRAFIA

1. AAVV. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 3.3.5.
2. Bencina D, Mrzel I, Tadina T and D Dorrer. (1987). *Mycoplasma* species in chicken flocks with different management systems. *Avian Pathol.* 16: 599-608.
3. Buni D, Kovács AB, Földi D, Bányai K, Bali K, Domán M, Wehmann E, Bradbury J, Bottinelli M, Catania S, Stefani E, Lysnyansky I, Kovács L, Grözner D, Gyuranecz M and Z Kreizinger. (2023). Development of molecular assays for the analysis of genetic relationships of *Mycoplasma iowae*. *Vet Microbiol.* 287: 109909.

4. Catania S, Bottinelli M, Fincato A, Tondo A, Matucci A, Nai G, Righetti V, Abbate F, Ramirez A, Gobbo F and M Merenda. (2024). Pathogenic avian mycoplasmas show phenotypic differences in their biofilm forming ability compared to non-pathogenic species in vitro. *Biofilm*. 7: 100190.
5. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Fincato A, Battanelli G and L Iob. (2012). Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. *Vet. Rec.* 170: 107-108.
6. Faburay B and D McVey. (2022). Mollicutes. *Vet Microbiol*. Wiley Blackwell, pp. 364-376.
7. Feberwee A, de Wit S and R Dijkman. (2022). Clinical expression, epidemiology, and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update. *Avian Pathol.* 51: 2-18.
8. Ferguson-Noel N, Raviv Z, Ley DH, Chin RP, Noormohammadi AH and JM Bradbury. (2019). Mycoplasmosis. In: *Diseases of Poultry*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 907-965.
9. Gautier-Bouchardon A. (2018). Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr.* 6: 10.1128.
10. McAuliffe L, Ellis R, Miles K, Ayling R and R Nicholas. (2006). Biofilm formation by *Mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*. 152: 913-922.
11. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD and RAJ Nicholas. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.* 54: 731-739.
12. Matucci A, Stefani E, Gastaldelli M, Rossi I, De Grandi G, Gyuranecz M and S Catania. (2022). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* outbreaks: a last decade study on Italian farms using GTS and MLST. *Vaccines*. 8: 665.
13. Michiels T, Welby S, Vanrobaeys M, Quinet C, Rouffaer L, Lens L, Martel A and P Butaye. (2016). Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathol.* 45: 244-252.
14. Sawicka-Durkalec A, Kurska O, Bednarz L and G Tomczyk. (2021). Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. *Sci. Rep.* 11: 17065.
15. Simmons WL, Daubenspeck JD, Osborne JD, Balish MF, Waites KB and K Dybvig. (2013). Type 1 and type 2 strains of *Mycoplasma pneumoniae* form different biofilms. *Microbiology*. 159: 737-747.
16. Wu Y, Yu Y, Hua L, Wei Y, Gan Y, Chenia H, Wang Y, Xie X, Wang J, Liu M, Shao G, Xiong Q and F Feng. (2022). Genotyping and biofilm formation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and their association with virulence. *Vet. Res.* 53: 95.

SICUREZZA ED EFFICACIA DI UN VACCINO VIVO ATTENUATO PER *SALMONELLA* ENTERITIDIS APPLICATO DURANTE IL PERIODO DELLA DEPOSIZIONE IN GALLINE OVAIOLE COMMERCIALI

Sisquella L.¹, Badiola I.², Vanyò L.², Rubio J.¹, Gomez M.¹

¹ *Laboratorios Calier S.A, Les Franqueses del Vallès, 08520 Barcelona, Spain;*

² *IRTA, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA, IRTA-UAB), Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

Summary

Salmonellosis caused by *Salmonella* Enteritidis is a widespread zoonosis and poultry products are an important source of infection. Because of that, vaccination of flocks against most common *Salmonella* serovars was one of the measures implemented in the NCP (National Control Plans).

The vaccination of laying hens with live vaccines against *Salmonella* Enteritidis applied in a 3-dose vaccination program during rearing, has been one of the measures implemented that has reduced the prevalence of *Salmonella* in poultry and therefore also the risk of transmission of salmonellosis to humans through the consumption of contaminated eggs. The current trend of extending the production period beyond the 90th week of life led to consider the introduction of a fourth dose of a live vaccine against *Salmonella* Enteritidis during laying to ensure that the poultry were protected until the end of a lengthy productive period. The application of a 4th dose of the vaccine at 55 weeks of age, under laboratory conditions, demonstrates that hens are protected until the end of an extended laying period by performing a challenge to 40 vaccinated hens at 95 weeks of age and to 30 non-vaccinated hens. The colonisation of challenge strains (tested by culture method) in liver, spleen, caeca, ovary, and oviduct of vaccinated animals (n=20) was reduced in comparison to non-vaccinated (n=20): 54% infected organs versus 74% in control the 1st week, and 28% versus 56% the 2nd week after challenge. The rates of *Salmonella* Enteritidis excretion in cloacal swabs were reduced within 2 weeks in vaccinated animals, while hens of control group were still positive the 3rd week after challenge. Regarding safety, 65 vaccinated hens were examined. The parameters that were taken into consideration were the spread and dissemination of vaccine strain (tested by culture method), the effect in egg production and any adverse reaction. Vaccine strain was not isolated from eggs (shell and content) laid from vaccinated hens (25 eggs were examined at days 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, and 28 post infection), from cloacal swabs taken for 3 weeks post challenge and neither from internal organs (5 animals were euthanised at 1, 7, and 14 days). In addition, no adverse reaction and no effects on egg production were detected after applying a 4th dose of the vaccine at laying.

INTRODUZIONE

La salmonellosi è la seconda zoonosi di origine alimentare più comune nell'Unione Europea. Dall'attuazione dei Programmi Nazionali di Controllo (PNC), il numero di casi umani è diminuito, ma negli ultimi anni il trend si è stabilizzato. Le principali fonti di *Salmonella* sono uova e carne di pollame. Per questo motivo, la vaccinazione

dei gruppi avicoli contro i sierotipi più comuni è stata una delle misure adottate per ridurre la prevalenza a livello di allevamento (EFSA, 2017). La vaccinazione può ridurre la presenza di *Salmonella* durante la fase produttiva e, di conseguenza, diminuire il rischio di trasmissione lungo la catena alimentare. Il sierotipo *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis* o SE) è il più frequentemente associato alla salmonellosi a livello globale, grazie alla sua capacità di contaminare l'interno dell'uovo. È stato dimostrato che questo sierotipo ha un tropismo particolare per l'apparato riproduttivo avicolo, riuscendo a persistere nell'ovidotto e nell'ovaio (De Buck et al., 2004). Pertanto, i vaccini devono garantire protezione contro la contaminazione delle uova dall'inizio alla fine del periodo di deposizione. Sono stati testati diversi vaccini vivi contro *S. Enteritidis*, con risultati variabili in termini di protezione durante la fase di deposizione (Atterbury et al., 2009, 2010). I vaccini possono ridurre la percentuale di uccelli positivi a SE (tramite tamponi cloacali, contenuto delle uova e carica cecale), ma non riescono a prevenire completamente la colonizzazione. L'obiettivo della vaccinazione è quindi ridurre la contaminazione delle uova, così da diminuire il rischio per la salute pubblica.

Esiste in commercio un vaccino vivo attenuato per *Salmonella enteritidis* (riferimento SE CAL10 Sm+/RIF+/Ssq-) che ha dimostrato efficacia nel proteggere le galline fino alla fine del ciclo di deposizione, anche quando sottoposte a challenge ad 80 settimane di età, dopo un programma vaccinale di 3 dosi durante la fase di accrescimento. Tuttavia, poiché si tende a prolungare il ciclo produttivo fino a 95–100 settimane per ragioni economiche e di sostenibilità, non è chiaro se i vaccini attuali offrano una protezione sufficiente nelle fasi più avanzate.

In questo studio è stata valutata la protezione contro un'infezione sperimentale da SE in galline di 95 settimane, vaccinate con una quarta dose del medesimo vaccino durante la deposizione (a 55 settimane). Sono stati confrontati l'escrezione e la colonizzazione del ceppo challenge tra il gruppo vaccinato e un gruppo di controllo non vaccinato. Uno degli obiettivi principali era anche la valutazione della sicurezza della quarta dose, considerando la diffusione del ceppo vaccinale, l'impatto sulla produzione di uova, e la presenza di eventuali reazioni avverse.

MATERIALI E METODI

Animali

Un totale di 65 galline ovaiole commerciali (razza Novogen), precedentemente vaccinate a 1, 6 e 15 settimane di età con il ceppo vaccinale SE CAL10 Sm+/RIF+/Ssq-, sono state trasferite a 53 settimane da un allevamento commerciale a una struttura sperimentale per ricevere una quarta dose dello stesso vaccino. Le galline sono state osservate per 2 settimane prima dell'inizio della prova per confermare l'assenza di infezione da *Salmonella*. Durante questo periodo sono stati analizzati anticorpi anti-*Salmonella* nel sangue, tamponi cloacali e organi interni, secondo il metodo ISO 6579-1:2017.

Alla 55^a settimana di età è stata somministrata la quarta dose del medesimo vaccino. Le galline sono state monitorate lungo un mese per valutare la sicurezza del vaccino. Successivamente, sono state mantenute fino alla fine del ciclo di deposizione (95 settimane) per effettuare un'infezione sperimentale con due ceppi di campo di *Salmonella* Enteritidis, al fine di valutare l'efficacia della quarta dose. Inoltre, 30 galline non vaccinate provenienti da un altro allevamento sono state inserite come gruppo di controllo.

Vaccino

È stato utilizzato un vaccino commerciale contenente un ceppo vivo attenuato di *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (riferimento SE CAL10 Sm+/RIF+/Ssq-) alla dose di $1-6 \times 10^8$ CFU per animale. In campo, il vaccino è stato somministrato secondo un programma a tre dosi tramite acqua di bevanda alle settimane 1, 7 e 15. Una dose aggiuntiva è stata somministrata per via orale alla 55^a settimana di età.

Infezione sperimentale (challenge)

L'inoculo è stato preparato con due ceppi di campo di *Salmonella* Enteritidis isolati da galline adulte. I batteri sono stati coltivati su agar Columbia con 5% di sangue ovino a 37 °C, poi sospesi in acqua peptonata tamponata (BPW) e regolati a una concentrazione di $2,39 \times 10^8$ CFU/animale.

Studio sulla sicurezza

Per valutare la diffusione del ceppo vaccinale, le 65 galline sono state monitorate per 28 giorni dopo la vaccinazione. Sono stati prelevati tamponi cloacali, rappresentativi delle feci fresche, per valutare la diffusione del vaccino durante le prime due settimane post-vaccinazione. Le uova deposte sono state esaminate per la presenza del ceppo vaccinale per 28 giorni e la colonizzazione degli organi interni è stata valutata in 25 animali ai giorni 1, 7 e 14. Inoltre, sono stati monitorati la produzione di uova e l'eventuale comparsa di segni clinici.

Studio sull'efficacia

Sono stati utilizzati 40 animali vaccinati (che avevano ricevuto quattro dosi a 1, 6, 15 e 55 settimane di età per via orale) e 30 animali non vaccinati (gruppo di controllo) provenienti da un altro allevamento. Alla fine del periodo di deposizione (95 settimane), tutti gli animali sono stati inoculati per via orale con una miscela dei due ceppi challenge (riferimenti IRTA-CReSA GN-0825 e GN-1063) alla dose di $2,39 \times 10^8$ CFU in 5 ml. Dopo l'infezione, sono stati prelevati tamponi cloacali da ciascun animale per rilevare i ceppi challenge tramite coltura microbiologica (secondo il metodo ISO 6579-1:2017). A 7 e 14 giorni post-infezione, 10 galline per gruppo sono state sopresse e sono stati prelevati campioni di fegato, milza, cieco, ovaio e ovidotto, che sono stati esaminati qualitativamente per la presenza dei ceppi infettanti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sicurezza

Dopo la somministrazione di un vaccino vivo durante la deposizione, la principale preoccupazione riguarda la destinazione del ceppo vaccinale e se gli animali vaccinati possano eliminarlo. Per studiarne la diffusione ed eventuale escrezione, è stata analizzata la sua presenza nella cloaca, nelle uova e negli organi interni. Inoltre, sono state valutate eventuali reazioni avverse e la produzione di uova durante il primo mese dopo la vaccinazione. I risultati di tutti i parametri analizzati sono riportati nella Tabella 1.

parameter	day of sampling	n° of samples / animal	total samples/results
cloacal swabs	-7d, d1, d7, d14	60 animals/day	245 swabs : all negative
egg inner and external content	-7d, d1, d3, d5, d7, d10, d14, d21, d28	25 animals/day (60 animals in 12 pooled samples at day -7)	520 inner/ external samples: all negative
internal organ colonization	-7d, d1, d7, d14	5 animals/day (2 animals at day -7) liver, spleen, ovary, oviduct, and cecum	85 organs. 3 positive (spleen and liver at day 1)
egg production	7d, d14, d21, d28	all animals (60)	5.7 eggs/week before vaccination and 5.9, 5.7, 5.8, and 5.8 eggs/week the four weeks post-vaccination, respectively. Animals from the same flock under field conditions: 5.8, 5.8, 5.9, and 5.6 eggs/week)
clinical signs	from -7d to d 28d	all animals (60)	no clinical signs

Tabella 1. Risultati sulla valutazione di sicurezza.

Le galline hanno mostrato buone condizioni di salute durante il mese di osservazione dopo la somministrazione della quarta dose, senza manifestare segni clinici o reazioni avverse.

L'escrezione del ceppo vaccinale è stata esclusa analizzando i tamponi cloacali nelle due settimane successive alla vaccinazione (ai giorni 1, 7 e 14). Tutti i campioni analizzati (n=245) sono risultati negativi per *Salmonella* spp., indicando che gli animali vaccinati non hanno eliminato il ceppo vaccinale tramite le feci. Dopo la somministrazione della quarta dose (giorni 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28), le uova di 25 galline vaccinate sono state analizzate per verificare la presenza del ceppo vaccinale: tutti i campioni (guscio e contenuto) sono risultati negativi. È stata quindi confermata l'assenza di *Salmonella* nelle uova deposte.

La presenza del ceppo vaccinale negli organi interni è stata analizzata al termine del periodo di sicurezza: gli animali sono stati soppressi ai giorni 1, 7 e 14 dopo la quarta dose, e sono stati prelevati campioni di fegato, milza, ovaio, ovidotto e cieco. Il giorno successivo alla vaccinazione sono stati rilevati 3 campioni positivi, corrispondenti a 2 animali (due fegati e una milza positivi), ma tutti gli altri campioni ai giorni 1, 7 e 14 sono risultati negativi. Questo risultato non è considerato grave, poiché fegato e milza non sono associati a una possibile escrezione. Nessun ceppo vaccinale è stato isolato nei giorni successivi, indicando che il ceppo ha bassa capacità di colonizzazione, ma sufficiente a stimolare la risposta immunitaria (come dimostrato nella sezione sull'efficacia). La produzione settimanale di uova è stata confrontata tra le due settimane precedenti la vaccinazione e le quattro settimane successive. La produzione non ha mostrato variazioni significative. Inoltre, i dati delle galline dello stesso lotto rimaste in allevamento hanno mostrato valori simili.

Efficacia

Il modo migliore per dimostrare che le galline sono protette contro *Salmonella* è attraverso un'infezione sperimentale con un ceppo di campo, valutando la capacità degli animali vaccinati di ridurre la colonizzazione degli organi interni e l'escrezione cloacale del ceppo infettante. Questo studio è stato condotto a 95 settimane di età,

includendo un gruppo di controllo non vaccinato. Il gruppo vaccinato con 4 dosi ha mostrato una maggiore tendenza a ridurre l'escrezione del ceppo challenge, interrompendola una settimana prima rispetto al gruppo di controllo (Figura 1). Questo è stato determinato analizzando i tamponi cloacali di tutti gli animali fino a 21 giorni dopo l'infezione sperimentale.

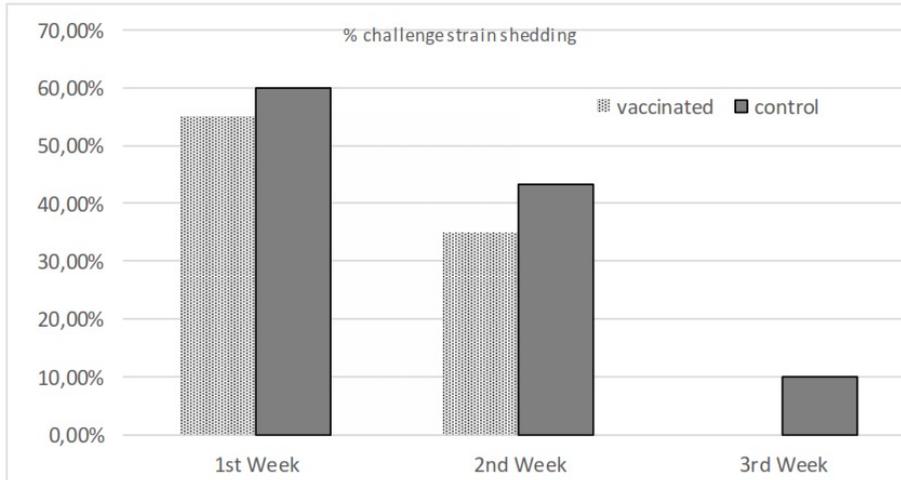


Figura 1. Escrezione del ceppo challenge.

La colonizzazione degli organi interni è stata valutata a 7 e 14 giorni post-infezione, analizzando campioni di cieco, milza, fegato, ovaio e ovidotto (Tabella 2). La percentuale di campioni positivi è risultata inferiore nel gruppo vaccinato rispetto al gruppo di controllo in entrambe le rilevazioni. Le differenze sono risultate statisticamente significative per ovaio e milza, e mostrano una tendenza nel cieco. Quando tutti gli organi sono stati valutati insieme, la riduzione è risultata significativa, indicando che è stata ottenuta una riduzione della colonizzazione.

group	7 days post infection						14 days post infection					
	Liver	Spleen	Caeca	Ovary	Oviduct*	total*	Liver	Spleen*	Caeca	Ovary	Oviduct	total*
vac.	100%	80%	60%	20%	10%	54%	70%	60%	10%	0%	0%	28%
	10/10	8/10	6/10	2/10	1/10	27/50	7/10	6/10	1/10	0/10	0/10	14/50
control	70%	90%	90%	50%	70%	74%	90%	100%	40%	20%	30%	56%
	7/10	9/10	9/10	5/10	7/10	37/50	9/10	10/10	4/10	2/10	3/10	28/50
Std	ns	ns	p=0.08	ns	p=0.001	p=0.037	ns	p=0.025	ns	ns	ns	p=0.005

Tabella 2. Colonizzazione degli organi interni da parte di *Salmonella* Enteritidis dopo l'infezione sperimentale. dpi: giorni post-infezione. Test del chi quadrato condotto con un livello di significatività bilaterale $< 0,05$ ($p \leq 0,1$).

Un'attenzione particolare è stata rivolta agli organi riproduttivi (ovaio e ovidotto), coinvolti nella contaminazione interna dell'uovo, e al cieco, che può contaminare il guscio tramite le feci. Nei soggetti vaccinati, la colonizzazione è risultata fortemente ridotta già al giorno 7, e completamente assente al giorno 14 in ovaio e ovidotto (Figura 2).

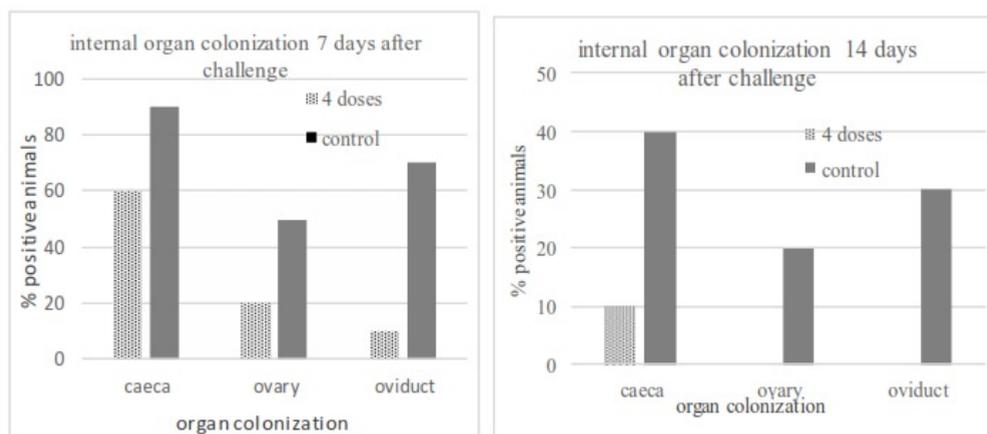


Figura 2. Colonizzazione del ceppo challenge.

CONCLUSIONI

Considerando la tendenza a prolungare i cicli produttivi delle galline ovaiole, è stato testato se il vaccino vivo attenuato ceppo SE CAL10 Sm⁺/RIF⁺/Ssq⁻, somministrato durante il periodo di deposizione alla 55^a settimana, dopo un programma a 3 dosi in fase di accrescimento, potesse offrire protezione nei confronti di un'infezione sperimentale con *Salmonella* Enteritidis in galline di 95 settimane. La batteriologia di fegato, cieco, milza, ovaio e ovidotto è stata confrontata con un gruppo di controllo non vaccinato. In entrambi i gruppi, la maggior parte dei campioni di fegato e milza è risultata positiva a 7 giorni post-infezione, probabilmente a causa dell'elevata dose di ceppo challenge. Tuttavia, a 14 giorni, le galline vaccinate hanno mostrato una riduzione della colonizzazione e l'eliminazione completa della contaminazione in ovaio e ovidotto. Questa eradicazione nei tessuti riproduttivi è cruciale, poiché la contaminazione interna dell'uovo da SE avviene principalmente attraverso la colonizzazione di ovaie, ovidotti e tessuti vaginali (De Buck et al., 2004). Inoltre, la contaminazione fecale del guscio può portare alla penetrazione del contenuto dell'uovo da parte di SE, ST e *Salmonella* Heidelberg (Humphrey, 1994; Schoeni et al., 1995; Messens et al., 2005). Pertanto, la riduzione della colonizzazione del cieco e dell'escrezione cloacale osservata nel gruppo vaccinato con la quarta dose potrebbe rappresentare un'ulteriore riduzione del rischio di contaminazione dell'uovo.

In conclusione, i risultati di questo studio indicano che la vaccinazione contro *Salmonella* può essere uno strumento efficace e importante all'interno di un programma completo di biosicurezza per il controllo della salmonellosi negli allevamenti avicoli industriali.

BIBLIOGRAFIA

1. Atterbury RJ, Allen VM, Carrique-Mas JJ and RH Davies. (2009). Salmonella colonisation of laying hens following vaccination with killed and live attenuated commercial Salmonella vaccines. *Vet. Rec.* 165:493–496.
2. Atterbury RJ, Morris V, Harrison D, Tucker V, Allen VM, Davies RH and JJ Carrique-Mas. (2010). Effect of delivery method on the efficacy of Salmonella vaccination in chickens. *Vet. Rec.* 167:161–164.

3. De Buck JF, Van Immerseel F, Haesebrouck F and R Ducatelle. (2004). Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella. *J. Appl. Microbiol.* 97:233–245.
4. EFSA. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 15:5077.
5. Messens WK. (2005). Eggshell penetration by Salmonella: a review. *World Poult. Sci. J.* 61:71–86.
6. Humphrey TJ. (1994). Contamination of egg shell and contents with Salmonella Enteritidis: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 21:31–40.
7. Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL and AC Wong. (1995). Growth and penetration of Salmonella Enteritidis, Salmonella Heidelberg and Salmonella Typhimurium in eggs. *Int. J. Food Microbiol.* 24:385–396.
8. Van De Reep L, Nielen M., Verstappen KMHW, Broens EM, Van Den Broek J and FC Velkers. (2018). Response to a Salmonella Enteritidis challenge in old laying hens with different vaccination histories. *Poult. Sci.* 0:1–7.

VALUTAZIONE IN VITRO DELLA SOPRAVVIVENZA DI *SALMONELLA GALLINARUM* NEL *DERMANYSSUS GALLINAE*

Salierno D., Pugliese N., Bove A., Giacomazzo M., Giordano V., Casalino G., Lombardi M., Perna V., Circella E., Camarda A.

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

Summary

Fowl typhoid (FT), caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*), represents a major threat to intensive poultry production due to its high mortality rate and substantial economic impact. One of the primary factors contributing to the persistence of this pathogen in poultry environments is *Dermanyssus gallinae*, a hematophagous ectoparasite known to act as a vector for various infectious agents.

In this study, poultry red mites (*D. gallinae*) were collected from a battery cage farm in Southern Italy during an FT outbreak, with the aim of evaluating the survival of *S. Gallinarum* under controlled laboratory conditions. Two mite samples were analyzed: one from a shed where clinical signs of the disease were evident, and a control sample from a shed with no observed clinical signs.

Weekly analyses were conducted over a 20-week period using both conventional bacteriological methods and a seminested PCR assay. *S. Gallinarum* DNA was consistently detected in the sample from the affected shed throughout the entire study period by sn-PCR. In contrast, culture-based isolation of the pathogen from the crop of mites was intermittent, with positive results observed until week 19. Sn-PCR proved to be more sensitive than traditional culture methods, enabling the detection of *S. Gallinarum* DNA beyond the timeframe in which viable bacteria could be isolated.

These findings support the hypothesis that *D. gallinae* may contribute to the environmental persistence of *S. Gallinarum* between production cycles. This highlights the need for integrated pest management strategies and rigorous sanitation protocols to reduce the risk of recurrent FT outbreaks in poultry farms.

INTRODUZIONE

La tifosi aviare è una patologia infettiva del pollame sostenuta da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*). La malattia, che è responsabile di mortalità molto alte negli animali in produzione, è particolarmente temuta a causa dell'impatto che può avere e per le misure di polizia veterinaria da adottare che incidono pesantemente sull'economia degli allevamenti (Barrow and Neto, 2011; Lee et al., 2020). Nonostante gli sforzi messi in campo per giungere ad una sua completa eradicazione, la tifosi aviare è ancora presente in tutto il mondo (Barrow and Neto, 2011; Lee et al., 2020). Particolarmente colpiti sono i paesi africani, quelli dell'Asia Orientale e dell'America del Sud (Barrow and Neto, 2011). In Europa è segnalata soprattutto nei paesi dell'Est mentre negli stati occidentali è presente saltuariamente. In Italia, la malattia circola ancora, sia pure con prevalenze molto basse.

Caratteristica epidemiologica importante della *Salmonella* Gallinarum è la sua capacità di persistere in allevamento. Il germe tende a ripresentarsi in azienda nei cicli successivi e la sua completa eliminazione risulta complessa, a causa della possibile presenza di

serbatoi e vettori, sia animati che inanimati, i quali ne consentono la sopravvivenza anche durante il vuoto sanitario e facilitano la reinfezione degli animali nel ciclo successivo (Davies and Breslin, 2003).

Tra gli agenti ritenuti tra i principali responsabili della persistenza della *S. Gallinarum* in allevamento vi è *Dermanyssus gallinae* (*D. gallinae*). Questo acaro ematofago è il più comune ectoparassita degli allevamenti avicoli intensivi (specie di quelli a vita produttiva lunga) in Europa (George et al., 2015) e in molti paesi extraeuropei (Roy and Buronfosse, 2011; Sparagano et al., 2009; Wang et al., 2010). Il suo ruolo di serbatoio di molti batteri e virus è stato accertato (Chirico et al., 2003; Circella et al., 2011; Klikha et al., 2024; Schiavone et al., 2020; Schiavone et al., 2022) così come la sua capacità di fungere da vettore e diffusore della *Salmonella* (Marino et al., 2016; Schiavone et al., 2023). Nel corso di precedenti ricerche, inoltre, *S. Gallinarum* è stata riscontrata in *D. gallinae* raccolti durante il periodo di vuoto sanitario (Marino et al. 2017; Pugliese et al., 2019). Queste osservazioni hanno portato a ritenere che l'acaro potesse fungere da serbatoio del germe e consentirne la sopravvivenza in assenza di animali, per poi favorire la diffusione dell'infezione nel ciclo successivo. Analoghe ipotesi erano state precedentemente poste anche da Valiente Moro et al., (2007) relativamente a *Salmonella* Enteritidis.

Queste osservazioni presuppongono che su, o in *D. gallinae*, *S. Gallinarum* possa sopravvivere per periodi di tempo lunghi, sufficienti comunque a consentirle di superare i periodi di vuoto nel capannone, e di ritrasmettersi agli animali col pasto di sangue o per altra via, ad esempio quella alimentare (Cocciolo et al., 2020). Al momento, tuttavia scarse sono le ricerche volte a definire in laboratorio questa stretta interazione tra acaro e germe, e che forniscano informazioni precise sul rischio che la presenza di *D. gallinae* ha di poter incidere sulla ricomparsa della tifosi nei cicli successivi.

Per questo, in occasione di un episodio spontaneo di tifosi aviare osservato in un allevamento del Sud Italia, è stata allestita una prova su acari infetti, raccolti in azienda, volta a definire i tempi di sopravvivenza di *Salmonella* Gallinarum in/su *Dermanyssus gallinae*. L'occasione è stata utile anche per confrontare due metodi diagnostici, uno tradizionale di tipo colturale, ed uno biomolecolare (Seminested PCR) (Pugliese et al., 2011) già precedentemente messo a punto presso la Sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Bari (Italia).

MATERIALI E METODI

Campionamento

Gli acari sono stati prelevati in un allevamento di ovaiole in gabbia del Sud Italia durante un episodio di Tifosi aviare. Il gruppo di animali, oltre alla mortalità elevata ed ai sintomi tipici della malattia, era contestualmente interessato da una infestazione di livello 4 di *Dermanyssus gallinae* (Cox et al. 2009).

Gli acari sono stati raccolti in almeno 12 punti diversi del capannone, facendo attenzione affinché lo stesso venisse campionato omogeneamente. Il campione è stato quindi suddiviso in 3 diverse aliquote (rispettivamente G1, G2 e G3), poste separatamente per 5 giorni in "starvation", al buio, in buste di plastica sigillabili insufflate con CO₂, a temperatura ambiente. Un secondo campione di *Dermanyssus gallinae* è stato prelevato da un capannone vicino dello stesso allevamento, gemello del precedente, in cui la Tifosi non era stata diagnosticata. Anche questo campione è stato trattato come il precedente. In laboratorio gli acari raccolti sono stati identificati utilizzando le chiavi morfologiche descritte da Varma (1993) e Baker (1999).

Ciascuna aliquota, è stata quindi sottoposta settimanalmente ad analisi batteriologica e biomolecolare secondo quanto riportato successivamente, per un totale di 20 settimane. Le analisi sono proseguite anche dopo che gli acari *in starvation* sono morti, al fine di verificare la capacità degli esoscheletri e dei residui derivanti dalla loro decomposizione di veicolare passivamente *Salmonella* Gallinarum.

Esami batteriologici

Ogni settimana, da ciascuna aliquota di entrambi i capannoni (G1, G2, G3 e G4) è stato prelevato un campione di acari del peso di 0,15 g (pari a circa 1600 acari ingorgati); ciascun campione è stato omogeneizzato meccanicamente mediante pestello sterile, sospeso in 5 mL di acqua peptonata e incubato in aerobiosi a 37°C per 24 ore. 50 µL della sospensione incubata sono stati ripassati su Xylose Lysine Deoxycholate agar (X.L.D.) e Hektoen Enteric agar (H.E.A.) ed incubati per ulteriori 24 ore a 37°C.

Le colonie sospette sono state ripassate su Tryptic Soy Agar (T.S.A.), ed incubate a 37°C per 24 ore. L'identificazione delle colonie è stata effettuata mediante API 20E (Biomerieux) e, biomolecolarmente, mediante Seminested Polymerase Chain Reaction (sn-PCR), secondo il protocollo descritto da Pugliese et al. (2011). I ceppi risultati positivi sono stati conservati a -20°C in glicerolo per successivi approfondimenti.

Analisi biomolecolari

Da ciascuna aliquota, settimanalmente, sono stati allestiti tre campioni, di trenta acari adulti ciascuno. Il DNA è stato estratto utilizzando un kit commerciale ZymoBiomics DNA Miniprep Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA) seguendo il protocollo fornito dal produttore.

Il DNA estratto è stato quindi sottoposto a Seminested PCR secondo il protocollo descritto da Pugliese et al. (2011). I primers delle 2 reazioni, disegnati su due distinte regioni cromosomiali, sono riportati nella Tabella 1.

Lo stesso procedimento è stato applicato agli acari del Campione 2 utilizzato come controllo negativo non infetto.

Tabella 1. Primers utilizzati nella Seminested Polymerase Chain Reaction (snPCR) secondo il protocollo descritto da Pugliese et al. (2011).

PRIMER	SEQUENZA	ALTEZZA BANDA
USG 1f	CGTTTACGGCATTACACAAGT	946bp
USG 1r	TATCGGCTCAAGTTACACAAAG	
USG 1f	CGTTTACGGCATTACACAAGT	783bp
USG 2f	GAAATTATATTGACTTTGATATG	

RISULTATI

La sopravvivenza di *Dermanyssus gallinae* nelle aliquote allestite a partire dai campioni prelevati nei 2 capannoni è risultata estremamente variabile.

Gli acari, del capannone 1, infatti, sono deceduti alla quarta, quinta e seconda settimana rispettivamente in G1, G2 e G3. Nel campione di controllo gli acari sono sopravvissuti per 3 settimane.

L'esame batteriologico ha evidenziato una certa disomogeneità nell'isolamento della *Salmonella* nelle diverse aliquote (Tabella 2). G2 è stata l'aliquote in cui *Salmonella* è risultata essere più costantemente isolata. Il germe, infatti, è stato evidenziato costantemente nella 1^a, 3^a e 4^a settimana di *starvation*, dalla 6^a alla 9^a e dalla 12^a alla 19^a rispettivamente, tranne nella 18^a settimana. In G1, invece, *Salmonella* è stata isolata alla 1^a, 2^a, 7^a e 14^a settimana, mentre in G3 solo alla 4^a ed alla 7^a settimana. Le indagini biomolecolari hanno costantemente evidenziato la presenza di *Salmonella Gallinarum* in G1, G2 e G3 per l'intero periodo di osservazione (Tabella 2). Il campione di controllo è sempre risultato negativo all'esame batteriologico e biomolecolare.

Tabella 2. Esiti dell'esame batteriologico e delle indagini biomolecolari per la ricerca di *Salmonella Gallinarum* nelle venti settimane di sperimentazione condotte su quattro gruppi di *Dermanyssus Gallinae* prelevati dal capannone sintomatico (gruppo 1, gruppo 2 e gruppo 3) e dal capannone privo di sintomatologia (gruppo 4).

	CAMPIONE 1						CAMPIONE 2	
	Gruppo 1		Gruppo 2		Gruppo 3		Gruppo 4,5,6	
	Batteriologico	PCR	Batteriologico	PCR	Batteriologico	PCR	Batteriologico	PCR
S1	+	+	+	+	-	+	-	-
S2	+	+	-	+	-	+	-	-
S3	-	+	+	+	-	+	-	-
S4	-	+	+	+	+	+	-	-
S5	-	+	-	+	-	+	-	-
S6	-	+	+	+	-	+	-	-
S7	+	+	+	+	+	+	-	-
S8	-	+	+	+	-	+	-	-
S9	-	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S10	-	+	-	+	-	+	n.e.	n.e.
S11	-	+	-	+	-	+	n.e.	n.e.
S12	-	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S13	-	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S14	+	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S15	-	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S16	-	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S17	-	+	+	+	-	+	n.e.	n.e.
S18	-	+	-	+	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
S19	-	+	+	+	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
S20	-	+	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

n.e. non eseguito a causa dell'esaurimento del campione

DISCUSSIONE

I risultati dei test effettuati in questo lavoro confermano l'importanza che *Dermanyssus gallinae* può rivestire nella persistenza di *Salmonella Gallinarum* negli allevamenti avicoli intensivi. Dopo 19 settimane, infatti, gli acari erano ancora infetti ed

hanno consentito l'isolamento del germe con le metodiche colturali tradizionali. A risultati analoghi era giunto Zeman nel 1982, il quale aveva evidenziato *S. Gallinarum* in acari refrigerati per almeno 4 mesi. Questo procedimento aveva mantenuto gli acari vitali, ma ha consentito una più facile sopravvivenza della *Salmonella* che, a temperature di refrigerazione tende a mantenersi in vita più a lungo (Pye et al., 2023).

È evidente, a parità di specificità, che le indagini biomolecolari siano in questi trials risultate estremamente più sensibili garantendo una maggiore omogeneità di risultati nel tempo (Schoonbroodt et al., 2023). Tale proprietà rende la Seminested-PCR adottata più efficace nel monitoraggio delle infezioni persistenti. Infatti, la discrepanza nei risultati osservata tra le metodiche tradizionali ed indagini biomolecolari dimostra come la negatività all'esame batteriologico non possa essere considerata un indicatore assoluto dell'assenza del microrganismo all'interno del campione, poiché la vitalità del batterio può sfuggire alle tecniche colturali (Lleo et al., 2014). Diversi fattori possono compromettere l'esito dell'esame batteriologico; una bassa carica batterica nel campione, ad esempio, può rappresentare un fattore limitante di particolare importanza (Schoonbroodt et al., 2023). Questo aspetto può essere ulteriormente aggravato da una disomogenea distribuzione delle Salmonelle negli acari. A questo proposito, precedenti ricerche hanno accertato che il numero di *Dermanyssus* infetti durante episodi acuti di malattia può variare tra 60 e 650/1000 acari e che la quantità di Salmonelle è compresa tra 10^3 e 10^6 cellule/acaro (Pugliese et al., 2019). Queste caratteristiche, ovviamente, possono influenzare gli esiti degli esami batteriologici, restituendo risultati falsamente negativi.

Al contrario, il ricorso alla sn-PCR garantisce risultati molto più costanti ed affidabili consentendo di individuare la presenza del germe anche in quantità molto ridotte (Macfarlane-Smith et al., 2018) e si configura se non come un'alternativa, almeno come un complemento essenziale alle tecniche tradizionali (Lleo et al., 2014), soprattutto in contesti in cui è necessario garantire rapidità, sensibilità e affidabilità nella diagnosi microbiologica. I risultati ottenuti in questo lavoro, inoltre, hanno evidenziato che l'adozione di una strategia di analisi basata sull'esecuzione del test molecolare su tre aliquote consente di aumentare la rappresentatività del campione, riducendo significativamente il rischio di falsi negativi.

Tuttavia, il riscontro del DNA batterico non equivale, secondo alcuni, necessariamente alla presenza di microrganismi vitali o infettanti (Macfarlane-Smith et al., 2018). I risultati dei test effettuati in questo lavoro sembrano, almeno in parte smentire tali affermazioni tenuto conto che campioni negativi, sono ritornati positivi all'esame batteriologico tradizionale dopo diverse settimane. Tuttavia, un approccio diagnostico quantitativo come, ad esempio, la q-PCR potrà consentire in futuro di stimare con maggiore precisione le variazioni nella carica batterica del campione, e di estrapolare dati circa la vitalità del germe (Rubio et al., 2017).

A complicare il quadro potrebbe intervenire anche la capacità che ha *Salmonella Gallinarum* di trasmettersi nell'acaro per via verticale (Schiavone et al., 2023). *Dermanyssus gallinae*, infatti, non funge soltanto da vettore passivo dell'infezione ma anche e soprattutto da serbatoio attivo del germe. In questo contesto l'attività riproduttiva rappresenta una opportunità per aumentare la prevalenza del germe nella popolazione di acari, aumentando il rischio che esso possa persistere all'interno del capannone.

La disgregazione del *Dermanyssus gallinae* legato al normale turnover biologico, costituisce certamente un ulteriore fattore di rischio di diffusione della malattia. La polvere che da tale disgregazione deriva si è dimostrata infetta per molte settimane e disperdendosi può contribuire attivamente alla colonizzazione del capannone da parte della *Salmonella*.

Se si considera che in questo lavoro *S. Gallinarum* si è mantenuta per almeno 20 settimane negli acari e nelle polveri da essi derivati, si comprende chiaramente che *Dermanyssus gallinae* può giocare un ruolo essenziale nella persistenza del germe da un ciclo all'altro dell'allevamento. I tempi di vuoto sanitario, infatti, che spesso non sono superiori alle 3 settimane non garantiscono la scomparsa e la morte della *Salmonella* prima dell'accasamento del ciclo successivo. Protocolli di pulizia e di sanificazione ambientale stringenti e accurati dovrebbero, pertanto, essere integrati da approfonditi monitoraggi microbiologici e molecolari in grado di dare informazioni sull'opportunità e sui tempi di riaccasamento per ridurre in maniera significativa il rischio di favorire la persistenza di *S. Gallinarum* tra un ciclo produttivo e l'altro (Naumovska et al., 2025).

Il monitoraggio e l'eradicazione delle infestazioni da *D. gallinae* negli allevamenti ovviamente costituiscono un obiettivo primario per la protezione della salute animale e la riduzione della circolazione di alcune malattie infettive (Schiavone et al., 2020; Schiavone et al., 2023). Questo approccio è fondamentale non solo per limitare le ripercussioni economiche negative derivanti dalla presenza dell'acaro (Sparagano et al., 2014), ma anche per controllare la trasmissione di malattie infettive all'interno delle popolazioni animali (Chirico et al., 2003; Circella et al., 2011; Valiente Moro et al., 2009).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio confermano che *Dermanyssus gallinae* è in grado di acquisire e mantenere *S. Gallinarum* per periodi prolungati di tempo rappresentando un importante fattore di rischio ai fini della persistenza dell'infezione in allevamento.

Sebbene ulteriori studi siano necessari per chiarire completamente il ruolo epidemiologico di *Dermanyssus gallinae* nella trasmissione di *S. Gallinarum*, i risultati ottenuti in questo studio offrono importanti spunti per l'approfondimento delle dinamiche che portano alla persistenza del germe e sottolineano il valore diagnostico delle tecniche biomolecolari, non solo come complemento ma anche come elemento chiave per una valutazione più sensibile e tempestiva della presenza di patogeni in contesti biologicamente complessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Akbayev RM, Belous AS, Trubnikova EV, Bogdanova ES, Belyakova AV, Epova EY, Zylkova MV, Biryukova YK and AB Shevelev. (2019). Impact of Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*) Infestation on Blood Parameters of Laying Hens. *BioNanoSci.* 10: 318–329.
2. Baker AS. (1999). Mites and ticks of domestic animals: An Identification Guide and Information Source. The Stationery Office, London, UK, pp. 192.
3. Barrow PA and OCF Neto. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.* 40(1): 1–13.

4. Chirico J, Eriksson H, Fossum O and D Jansson D. (2003). The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Med. Vet. Entomol.* 17(2): 232–234.
5. Circella E, Pugliese N, Todisco G, Cafiero MA, Sparagano OA and A Camarda. (2011). *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*. *Exp. Appl. Acarol.* 55(4): 329–338.
6. Coccio G, Circella E, Pugliese N, Lupini C, Mescolini G, Catelli E, Borchert-Stuhlträger M, Zoller H, Thomas E and A Camarda. (2020). Evidence of vector borne transmission of *Salmonella enterica enterica* serovar Gallinarum and fowl typhoid disease mediated by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Parasit. Vectors.* 13(1): 513.
7. Cox M, De Baere K, Vervaeke E, Zoons J and T Fiks-Van Niekerk. (2009). Red mites: monitoring method and treatment. *Proceedings of the 8th European Symposium on Poultry Welfare*, 18–22 May 2009, Cervia, p. 83.
8. Davies RH and M Breslin. (2003). Persistence of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm. *Environ. Microbiol.* 5(2): 79–84.
9. Decru E, Mul M, Nisbet AJ, Vargas Navarro AH, Chiron G, Walton J, Norton T, Roy L and N Sleenckx. (2020). Possibilities for IPM Strategies in European Laying Hen Farms for Improved Control of the Poultry Red Mite (*Dermanyssus gallinae*): Details and State of Affairs. *Front. Vet. Sci.* 7: 565866.
10. George DR, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Valiente Moro CV and OAE Sparagano. (2015). Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? *Parasit. Vectors.* 8: 178.204.
11. Klikha A, Schiavone A, Djemai S, Samarelli R, Aissi M, Pugliese N, Khoualed Y and A Camarda. (2024). Molecular detection of avian pathogens in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in Algerian layer farms as a potential predictive tool. *Acta Trop.* 258: 107345.
12. Lee HJ, Jeong JY, Jeong OM, Youn SY, Kim JH, Kim DW, Yoon JU, Kwon YK and MS Kang. (2020). Impact of *Dermanyssus gallinae* infestation on persistent outbreaks of fowl typhoid in commercial layer chicken farms. *Poult. Sci.* 99(12): 6533–6541.
13. Lleo MM, Ghidini V, Tafi MC, Castellani F, Trento I and M Boaretti. (2014). Detecting the presence of bacterial DNA by PCR can be useful in diagnosing culture-negative cases of infection, especially in patients with suspected infection and antibiotic therapy. *FEMS Microbiol. Lett.* 354(2): 153–160.
14. Macfarlane-Smith LR, Ahmed S and MH Wilcox. (2018). Molecular versus culture-based testing for gastrointestinal infection. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 34(1): 19–24.
15. Marino M, Pugliese N, Circella E, Coccio G, De Virgilio C, Romito D, D’Onghia F and A Camarda. (2016). Ruolo di *Dermanyssus gallinae* nella persistenza di *Salmonella Gallinarum* in allevamento. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (SISVet)*, 70, pp. 198–204.
16. Naumovska S, Blagojević B, Galfi Vukomanović A, Pajić M, Knežević S and B Đurđević. (2025). Biosecurity measures for prevention and control of *Salmonella* in poultry farms. *Contemp. Agric.* 74(1): 1–8.

17. Ojima S, Okamura M, Osawa N, Tamura A, Yoshioka K, Kashimoto T, Haneda T, Ono HK and DL Hu. (2021). Characteristics of systemic infection and host responses in chickens experimentally infected with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. *J. Vet. Med. Sci.* 83(7): 1147–1154.
18. Pugliese N, Circella E, Cocciolo G, Giangaspero A, Horvatek Tomic D, Kika TS, Caroli A, and A Camarda. (2019). Efficacy of λ -cyhalothrin, amitraz, and phoxim against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 (Mesostigmata: Dermanyssidae): an eight-year survey. *Avian Pathol.* 48(sup1): S35–S43.
19. Pugliese N, Circella E, Marino M, De Virgilio C, Cocciolo G, Lozito P, Cafiero MA and A Camarda A. (2019). Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* 33(1): 162–170.
20. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A and A Camarda. (2011). Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum. *J Microbiol.Methods.* 85(1): 22–27.
21. Pye HV, Thilliez G, Acton L, Kolenda R, Al-Khanaq H, Grove S and RA Kingsley. (2023). Strain and serovar variants of *Salmonella enterica* exhibit diverse tolerance to food chain-related stress. *Food Microbiol.* 112: 104237.
22. Roy L and T Buronfosse. (2011). Using mitochondrial and nuclear sequence data for disentangling population structure in complex pest species: a case study with *Dermanyssus gallinae*. *Plos One.* 6:e22305.
23. Rubio MDS, Penha Filho RAC, Almeida AM and A Berchieri Jr. (2017). Development of a multiplex qPCR in real time for quantification and differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum. *Avian Pathol.* 46(6): 644–651.
24. Schiavone A, Pugliese N, Circella E and A Camarda. (2020). Association between the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* and potential avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Parasitol.* 284: 109198.
25. Schiavone A, Pugliese N, Otranto D, Samarelli R, Circella E, De Virgilio C and A Camarda. (2022). *Dermanyssus gallinae*: the long journey of the poultry red mite to become a vector. *Parasit. Vectors.* 15: 29.
26. Schiavone A, Pugliese N, Siddique I, Samarelli R, Saleh MS, Lombardi R, Circella E and A Camarda. (2023). Vertical Transmission of *Salmonella enterica* ser. Gallinarum in *Dermanyssus gallinae* by the Mean of the Baudruche-Based Artificial Feeding Device. *Appl. Sci.* 13(3): 1929.
27. Schoonbroodt S, Ichanté JL, Boffé S, Devos N, Devaster JM, Taddei L, Rondini S, Arora AK, Pascal T and L Malvaux. (2023). Real-time PCR has advantages over culture-based methods in identifying major airway bacterial pathogens in chronic obstructive pulmonary disease: Results from three clinical studies in Europe and North America. *Front. Microbiol.* 13: 1098133.
28. Shivaprasad HL. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech.* 19(2): 405–424.
29. Soria MC, Soria MA and DJ Bueno. (2012). Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. *Poult. Sci.* 91(3): 616–626.
30. Sparagano O, Pavličević A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, Mul

- M, van Emous R, le Bouquin S, Hoel K and MA Cafiero. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Exp. Appl. Acarol.* 48: 3-10.
31. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and A Giangaspero. (2014). Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 447-466.
 32. Tucci EC, Prado AP and RP Araújo. (2008). Development of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) at different temperatures. *Vet. Parasitol.* 155(1-2): 127–132.
 33. Valiente Moro C, Chauve C and L Zenner. (2005). Vectorial role of some dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssidae). *Parasite.* 12: 99-109.
 34. Valiente Moro C, Chauve C and L Zenner. (2007). Experimental infection of *Salmonella* Enteritidis by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol.* 146(3-4): 329–336.
 35. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OA and L Zenner. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol.* 48(1-2): 93–104.
 36. Varma MGR. (1993). Ticks and Mites (Acari). In: Lane RP, Crosskey RW (Eds), *Medical Insects and Arachnids*, University Press, Cambridge, pp. 597-658.
 37. Waiswa P, Lubowa NM and JL Nakavuma. (2006). Seroprevalence and excretion status of *Salmonella* pullorum-gallinarum in chicken around Kampala, Uganda. *AJABS.* 1(1): 46–55.
 38. Wales A and J Lawes. (2023). JMM Profile: *Salmonella enterica* serovar Gallinarum, biovars Pullorum and Gallinarum. *J. Med. Microbiol.* 72(2).
 39. Wang FF, Wang M, Xu FR, Liang DM and BL Pan. (2010). Survey of prevalence and control of ectoparasites in caged poultry in China. *Vet. Rec.* 167: 934-937.
 40. Zeman P, Štika V, Skalka B, Bártík M, Dusbábek F and M Lávičková. (1982). Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullurosis-typhus in hens. *Folia Parasitol.* 29: 371-374.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *ENTEROBACTERIACEAE* IN ALLEVAMENTI AVICOLI FAMILIARI DELLA REGIONE CAMPANIA

Longobardi M., Pace A., Dipineto L., Borrelli L., Fioretti A., Santaniello A.

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, via F. Delpino 1, 80137 Napoli, Italia.

Summary

Social Agriculture systems (SA) have been attracting increasing interest, favoring the spread of family-run poultry farms and their integration into multifunctional realities, such as educational farms and agritourisms. These structures frequently host different domestic species cohabiting in the same environment, especially poultry, and are additionally visited by families looking for direct or indirect contact with nature and animals. Within this context, the potential risk of visitor exposure to zoonotic agents, from animal or environmental sources cannot be overlooked. Therefore, this study was conducted with the aim of evaluating the presence of potential zoonotic bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* (e.g., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) in these farms. Questionnaire surveys were administered to 47 SA farms within the Campania Region, hosting poultry species, to collect information regarding farm context, visitor presence and biosecurity measures. Four environmental samples (i.e., surface swab) and ten cloacal swab samples were collected for each SA farm. Eggs were additionally collected for bacteriological investigation from 26 SA farms. The results showed the presence of *E. coli* in 32 (68.1%) SA farms, while all samples were negative for *Salmonella* spp. and other *Enterobacteriaceae*. *E. coli* strains were mainly detected from animal samples (no. 73 strains), and to a lesser extent from environmental samples (no. 21 strains), whereas egg samples were always negative. The results of the present study show that poultry present in SA farms can act as carriers of potentially pathogenic agents. Therefore, it is recommended that all facilities hosting poultry species and with the possibility of interaction with the public carry out a continuous monitoring and control plan for infectious agents potentially harmful to humans, including proper animal management and strict biosecurity measures.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'interesse per modelli di agricoltura sostenibile e a filiera corta ha favorito la diffusione di allevamenti avicoli a conduzione familiare, spesso integrati in realtà multifunzionali come fattorie didattiche e aziende agrituristiche. Queste strutture, sempre più presenti anche nella Regione Campania, non solo rappresentano un'importante fonte di reddito e valorizzazione del territorio, ma svolgono anche un ruolo educativo e ricreativo, promuovendo il contatto diretto tra cittadini, studenti e animali da allevamento, oltre che una forma di attrazione turistica sempre più alla ricerca di un paesaggio che lega natura e ambiente (Terkenli et al., 2018). D'altronde, le persone che entrano in contatto con gli animali presenti in questi contesti, beneficiano della relazione con la natura e con gli animali stessi. In questo contesto, è importante sottolineare che anche le attività svolte negli allevamenti avicoli familiari, attraggono un numero elevato di visitatori, in particolare bambini; le suddette attività offrono una possibilità di crescita personale, sicuramente data anche dall'effetto dello svolgimento e della partecipazione ad attività all'aria aperta. Inoltre, è stato riscontrato che questo tipo di attività a contatto con la natura porta ad aumento del benessere e della qualità di vita (Murrone et al., 2021). D'altro canto, i bambini risultano generalmente più vulnerabili alle infezioni zoonotiche sia per una maggiore suscettibilità fisiologica sia per pratiche igieniche spesso meno rigorose rispetto agli adulti. Il contatto diretto o indiretto con gli animali, sebbene possa offrire esperienze positive,

non è esente da rischi di trasmissione di agenti patogeni zoonotici, soprattutto in contesti come quelle dell'Agricoltura Sociale (AS) dove le misure di biosicurezza possono risultare meno strutturate. Inoltre, va considerato che gli animali da allevamento possono fungere da serbatoi e vettori di batteri antibiotico-resistenti, contribuendo alla loro diffusione nell'ambiente e potenzialmente nella popolazione umana, anche in assenza di manifestazioni cliniche negli animali stessi. In questo contesto, la famiglia delle *Enterobacteriaceae* riveste un'importanza particolare: essa include batteri come *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. ed *Enterobacter* spp., alcuni dei quali sono noti per la loro capacità di causare infezioni gastrointestinali e sistemiche nell'uomo e negli animali. Alla luce di queste considerazioni, è fondamentale valutare attentamente le modalità di interazione tra esseri umani, animali e ambiente, con l'obiettivo di preservare esperienze benefiche e piacevoli legate al contatto con gli animali e con la natura stessa, senza però tralasciare i potenziali rischi in tema di sicurezza sanitaria. Pertanto, l'obiettivo del presente studio è di valutare la presenza di *Enterobacteriaceae* in allevamenti avicoli familiari della Campania, con un focus particolare su quelli inseriti in contesti di AS come fattorie didattiche e aziende agrituristiche, al fine di delineare un quadro del rischio microbiologico associato a questi contesti e a proporre eventuali strategie di prevenzione e controllo.

MATERIALE E METODI

Area di Studio e Questionari per la raccolta di dati aziendali

Sono state sottoposte a monitoraggio 47 aziende suddivise in aziende agrituristiche e fattorie didattiche, variamente distribuite sul territorio campano tra le province di Napoli (15%), Salerno (36%), Benevento (19%), Caserta (17%) e Avellino (13%). Le aziende campionate sono state scelte in base alla presenza di un allevamento avicolo familiare, la disponibilità del proprietario, la distribuzione geografica sul territorio. Presso ciascuna azienda è stato compilato un questionario sulle caratteristiche strutturali dell'azienda, gli animali presenti in fattoria, la tipologia e la frequenza dei visitatori, le possibili modalità di contatto con gli animali stessi da parte dei visitatori. Particolare attenzione è stata posta sugli aspetti sanitari e le misure di prevenzione adottate dagli operatori verso le principali malattie oggetto di studio.

Campionamento e Isolamento batterico

Nel periodo tra settembre 2023 e giugno 2025, in ciascun'azienda sono stati prelevati dieci tamponi cloacali dalle specie avicole ospitate, quattro tamponi ambientali dalle superfici esposte al pubblico (e.g., staccionate, panchine, etc.) e, dove possibile, campioni di uova. Il prelievo dei tamponi cloacali è stato effettuato nel rispetto del benessere degli animali e senza infliggere loro alcuna inutile sofferenza. I tamponi sono stati conservati in condizioni di refrigerazione e trasportati presso il laboratorio del Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò, afferente al Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II. Tutti i campioni sono stati processati per la ricerca di *Enterobacteriaceae*, seguendo le metodiche standard internazionali e le procedure operative standard interne al laboratorio.

RISULTATI

I risultati ottenuti dal campionamento effettuato in 27 aziende agrituristiche, 19 fattorie didattiche, e una struttura che ha entrambe le denominazioni, hanno mostrato la presenza di *Escherichia coli* in un gran numero di aziende (32/47, 68,1%); al contrario, tutte le aziende sono risultate negative alla presenza di *Salmonella* spp. e altre *Enterobacteriaceae*. Nello specifico, in 20 aziende (42,6%) sono risultati positivi i campioni di origine animale; in 4 aziende (8,5%) sono risultati positivi i campioni di origine ambientale; infine, in 8 aziende (17%) sono risultati positivi entrambi i tipi di campioni. Dai campionamenti delle uova, effettuati in 26 aziende, non sono state isolate *Enterobacteriaceae*. In totale sono stati isolati 94 ceppi di *E. coli*, di cui 73 da 470 campioni cloacali (15,5%) e 21 da 188 campioni ambientali (11,2%).

Tabella 1. Prevalenza di *E. coli* isolati da tamponi cloacali e ambientali in 32 allevamenti avicoli familiari della Regione Campania.

Tipologia aziendale	Provincia	Prevalenza di <i>E. coli</i>	
		Tamponi cloacali	Tamponi ambientali
FD	SA	90%	0%
FD	NA	60%	0%
AG	SA	100%	25%
AG	SA	0%	50%
FD	SA	20%	75%
AG	SA	20%	25%
AG	SA	20%	0%
AG	SA	30%	0%
AG	SA	10%	25%
AG	SA	20%	0%
AG	SA	0%	50%
FD	CE	10%	0%
AG	BN	20%	50%
FD	AV	10%	0%
FD	CE	10%	0%
AG	BN	50%	0%
AG	SA	60%	0%
AG	CE	20%	25%
AG	CE	10%	0%
AG	BN	20%	0%
AG	AV	0%	25%
FD	CE	20%	0%
AG	AV	30%	0%
AG-FD	CE	10%	100%
AG	BN	0%	25%
FD	CE	10%	0%
AG	BN	20%	0%
AG	AV	20%	50%
AG	SA	10%	0%
FD	BN	10%	0%
AG	BN	10%	0%
AG	NA	10%	0%

AG: Azienda agrituristica; FD: Fattoria didattica

DISCUSSIONE

I risultati della nostra indagine hanno evidenziato una prevalenza molto alta di *E. coli* in tutti gli allevamenti avicoli familiari, suddivisi in aziende agrituristiche e fattorie didattiche. Tuttavia, per quanto riguarda gli *E. coli* produttori di Shiga-tossine sono necessari ulteriori approfondi-

menti per valutarne la presenza attraverso la siero-agglutinazione rapida con i sieri polivalenti e monovalenti ed indagini molecolari per la ricerca di quei geni di virulenza che codificano per le tossine (e.g., stx1 e stx2).

È interessante notare che tutti gli animali risultati positivi a *E. coli* non manifestavano alcun sintomo ascrivibile ad infezione e/o patologia gastroenterica. Infatti, *E. coli* fa parte della flora intestinale commensale dell'uomo e di altri animali omeoterme (Riley, 2020). Le infezioni da *E. coli* nelle specie avicole, note come colibacillosi, rappresentano una sfida considerevole per gli allevatori di pollame di tutto il mondo, in termini di riduzione del benessere animale e dei costi di produzione. Nell'uomo, nonostante la maggior parte dei ceppi siano innocui, alcuni ceppi sono responsabili 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. Gli enterobatteri, infatti, possono essere causa di diverse infezioni, anche gravi, in ambiente ospedaliero (Khatri et al., 2012). Infine, per le modalità di allevamento allo stato semibrado, gli animali allevati hanno modo di venire a contatto con altri animali domestici, con animali selvatici e con l'uomo, sostenendo eventualmente il ruolo di "interfaccia ecologica" fra ambienti rurali ed urbani o più semplicemente fungere da reservoir di agenti patogeni a tropismo gastroenterico quali *E. coli* produttori di Shiga-tossine.

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questa ricerca confermano che la presenza di animali in contesti educativi potrebbe rappresentare una potenziale fonte di diffusione di agenti patogeni nell'ambiente. In particolare, il monitoraggio delle *Enterobacteriaceae* nell'ambito degli allevamenti avicoli familiari della Campania, presenti in aziende agrituristiche e fattorie didattiche, in cui gli animali sono allevati anche a scopi zooantropologici e/o didattici, si rivela fondamentale non solo per arricchire ulteriormente la letteratura scientifica in materia di zoonosi, ma anche per evidenziare il vuoto legislativo in materia di Sanità Pubblica nella zooantropologia e la necessità di migliorare i protocolli sanitari destinati ed applicati a tali specie animali, riguardanti non solo gli agenti patogeni specie specifici, ma anche importanti agenti di zoonosi. Infine, considerando il rischio di contaminazione ambientale, il monitoraggio di tali agenti patogeni, può contribuire a individuare tempestivamente eventuali criticità nella gestione dei rifiuti o nella qualità dell'acqua, che richiedono interventi correttivi mirati.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Murrioni V, Cavalli R, Basso A, Borella E, Meneghetti C, Melendugno A and F Pazzaglia. (2021). Effectiveness of therapeutic gardens for people with dementia: a systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 18(18): 9595.
3. Riley LW. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 8(4): 10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020.
4. Ronco T, Stegger M, Olsen RH, Sekse C, Nordstoga AB, Pohjanvirta T, Lilje B, Lyhs U, Andersen PS and K Pedersen. (2017). Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC Genomics.* 18(1): 13.
5. Terkenli T, Cisani M and B Castiglioni. (2018). Is there a future for tourism in terraced landscapes? A comparative study of landscape resources and tourism consequences in Valtellina (Italy) and Lesvos (Greece). *Annales, Ser. Hist. Sociol.* 28(4): 725-740.

PRIMO ISOLAMENTO DI *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE* IN UNA GAZZA MARINA NEL SUD ITALIA

Sapio M.¹, Lucibelli F.², Minichino A.¹, Aceto S.², Balestrieri R.³, Santaniello A.¹, Fioretti A.¹, Dipineto L.¹, Borrelli L.¹

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Via Federico Delpino 1, 80137 Napoli, Italia;

²Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Via Cupa Nuova Cinthia 21, 80126 Napoli, Italia;

³Stazione Zoologica Anton Dohrn – CRIMAC, Centro Ricerche e Infrastrutture Marine Avanzate in Calabria, Dipartimento di Ecologia Marina Integrativa, c. Torre Spaccata, 87071 Amendolara (CS), Italia.

Summary

In the winter of 2022/2023, during an exceptional irruptive event, a Razorbill (*Alca torda*) was found beached in Bacoli, Southern Italy. It was subjected to post-mortem examination, leading to the first reported isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from a bird. Anatomopathological, histological, bacteriological, and molecular examinations, including amplification and sequencing of the 16S ribosomal DNA, *ureC* gene and genes encoding for virulence factors (*dly*, *hlyA_{pl}* and *hlyA_{ch}*), confirmed the characterization and virulence of the bacterial strain. The results of the study revealed a new cross-species transmission of the bacterium, highlighting its zoonotic potential and therefore raising concerns about potential implications for marine wildlife, aquaculture and human health.

INTRODUZIONE

Photobacterium damsela subsp. *damsela* è un batterio diffuso nell’ecosistema marino, in cui è presente sia come microrganismo che si muove liberamente nell’acqua, sia come agente patogeno emergente di vari animali marini, inclusi molluschi, crostacei, pesci e cetacei. È noto per causare forme setticemiche emorragiche in diverse specie ittiche, sia selvatiche sia allevate, con rilevanti perdite economiche nell’ambito dell’acquacoltura. Oltre alla sua importanza in ambito veterinario, questo microrganismo è anche un patogeno zoonotico, in grado di causare nell’uomo lesioni cutanee che, in casi gravi, possono evolvere in fascite necrotizzante con esiti potenzialmente fatali (Gouife et al., 2022; Rivas et al., 2013). Ad oggi, non sono documentati in letteratura casi di infezione da *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* negli uccelli. La gazza marina (*Alca torda*) è un uccello marino che nidifica in colonie di grandi dimensioni su rocce e scogliere dell’Atlantico. L’80% della popolazione, costituita da circa un milione di adulti, è distribuito lungo le coste islandesi e britanniche (Lavers et al., 2007). Durante la stagione riproduttiva, le gazze marine migrano verso sud, nelle acque aperte del Nord Atlantico, dove trascorrono l’inverno (Harrison et al., 2021). Solo un piccolo numero di individui si spinge al Mar Mediterraneo e al Nord Africa (Carboneras et al., 1988). Negli ultimi anni, in letteratura sono state riportate diverse irruzioni nel Mar Mediterraneo con lo spostamento di decine o centinaia di gazze marine sulle coste di Paesi come Spagna, Francia, Grecia, Italia, ma anche Algeria, Tunisia, Libia e Malta (Balestrieri et al., 2023; Boutabia et al., 2023). In Italia, l’irruzione più recente risale all’inverno del 2022/2023. Durante questo periodo sono stati osservati più di 700 individui tra giovani e adulti in nove regioni italiane. È stato ipotizzato che alla base di questa irruzione ci siano stati degli eventi meteorologici eccezionali, ovvero una serie di

correnti a bassa pressione che originatesi nell'Atlantico avrebbero spinto le gazze marine verso sud, fino allo stretto di Gibilterra (Balestrieri et al., 2023). La gran parte delle segnalazioni è avvenuta a breve distanza dalla costa e presso i porti, dove sono stati osservati uccelli “elemosinare” direttamente cibo dall'uomo e nutrirsi degli scarti della pesca *bycatch* gettati dai pescherecci (Monti et al., 2024). Tali osservazioni sono state accompagnate dal ritrovamento di alcuni esemplari spiaggiati in sette regioni italiane (Balestrieri et al., 2023).

MATERIALI E METODI

Il 16 gennaio 2023, un esemplare femmina di gazza marina (*Alca torda*) in modeste condizioni nutrizionali e con un peso di circa 800 grammi è stato rinvenuto morto a Bacoli, nel Sud Italia, e successivamente sottoposto ad esame post-mortem.

Durante la necropsia, sono stati prelevati campioni di polmone, rene, fegato e cuore per eseguire gli esami istologici. I campioni sono stati fissati in formalina al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a 4 micron e sottoposti a colorazione con ematossilina ed eosina (H&E). Per l'analisi batteriologica, campioni di polmone, fegato e rene sono stati inoculati su tryptone soy agar (TSA), agar-sangue al 5% e MacConkey agar, quindi incubati a 37°C per 24–48 ore. Le colonie isolate sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF. La conferma molecolare della presenza di *Photobacterium damsela* è stata ottenuta tramite PCR, con amplificazione dei geni 16S rRNA e *ureC*. Il DNA è stato estratto da 1 grammo di tessuto polmonare, epatico\splenico e renale utilizzando il metodo CTAB (Doyle et al., 1990). Per valutare la virulenza del batterio, è stato effettuato uno screening PCR per amplificare i geni presenti nel plasmide pPHDD1, che codificano per la damselisina (*dly*) e l'emolisina A (*hlyApl*), e il gene cromosomiale *hlyAch* (Alba et al., 2016; Rivas et al., 2013). I prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio (1,5%) a 100 V. Le immagini sono state acquisite utilizzando il sistema di imaging GelDoc Go (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Infine, i prodotti dell'amplificazione dei geni del DNA ribosomiale 16S e *ureC* sono stati sequenziati direttamente mediante il metodo di Sanger (Eurofins Genomis, Ebersbeng, Germania).

RISULTATI

L'esame post-mortem non ha rilevato segni di trauma, ma ha evidenziato una celomite con grave congestione del fegato, dei polmoni, dei reni e del miocardio (Fig. 1).

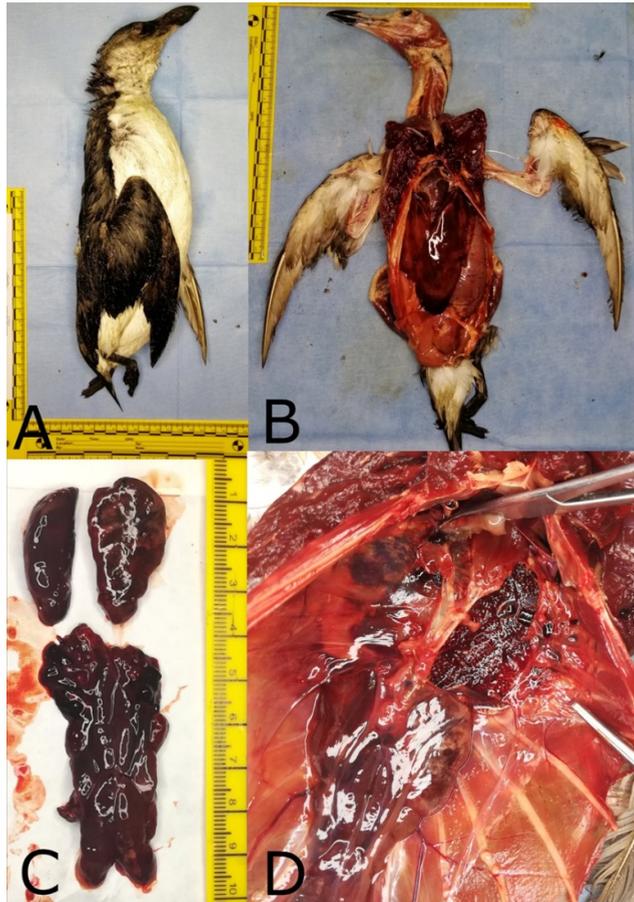


Figura 1. Esame anatomico-patologico macroscopico dell'esemplare di gazza marina (*Alca torda*) (A); Aspetto della celomite (B) secondaria alla setticemia con grave congestione di fegato, reni (C) e polmoni (D).

All'esame colturale, 48 ore dopo l'inoculo su terreno agar-sangue, sono state osservate colonie batteriche pure costituite da cocci di forma sferica o ovoidale, di 1-2 μm di diametro, compatibili col genere *Photobacterium*. La PCR ha prodotto frammenti di lunghezza prevista (Fig. 2). La PCR ha confermato la presenza di *Photobacterium damsela* nei tessuti polmonari, epatico/splenici e renali, con identificazione specifica della sottospecie *damselae* tramite amplificazione del gene *ureC*. Sono stati rilevati anche geni associati alla virulenza nell'isolato polmonare. All'esame istologico, il fegato mostrava un infiltrato infiammatorio perivascolare multifocale e severo, composto principalmente da linfociti e plasmacellule (Fig. 3A). Il polmone presentava infiltrati infiammatori lievi dello stesso tipo cellulare, accompagnati da emorragie diffuse, congestione vascolare e edema alveolare (Fig. 3B). A livello renale, si osservavano necrosi tubulare, estese emorragie e infiammazione linfoplasmacellulare (Fig. 3C). Il miocardio mostrava infiltrati infiammatori modesti e multifocali (Fig. 3D).

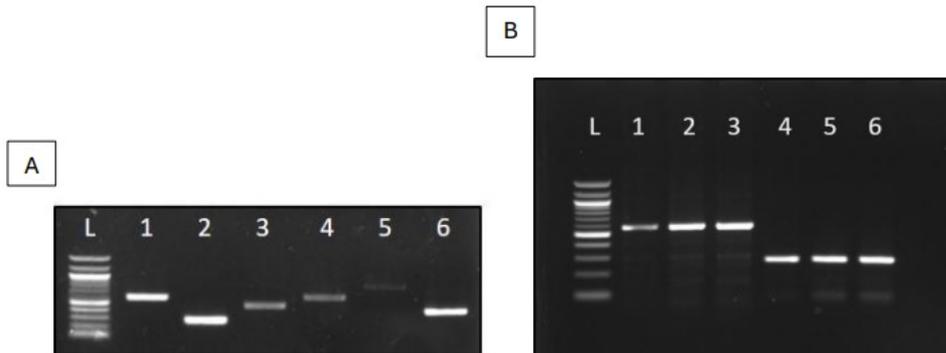


Figura 2. A) Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione dei geni di *Photobacterium damsela* isolato dal tessuto polmonare. Ladder del DNA da 100 bp (NEB, Ipswich, MA, USA) (L); 16S (1, 2); ureC (3); dly (4); hlyApl (5); hlyAch (6). B) Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione dei geni di *Photobacterium damsela* isolato dal tessuto epatico, renale e polmonare. Ladder del DNA da 100 bp (NEB, Ipswich, MA, USA) (L); 16S dal tessuto epatico (1, 4), renale (2, 5) e polmonare (3, 6).

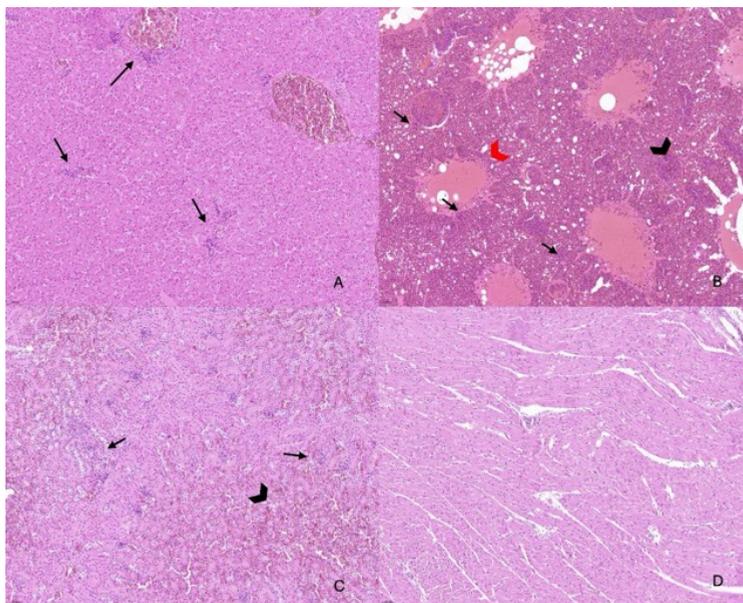


Figura 3. Esame istologico del fegato (A), polmone (B), rene (C) e cuore (D) dell'esemplare di gazza marina. (A) Moderata infiltrazione periportale di linfociti e cellule plasmatiche (freccie) con distribuzione multifocale. (B) Congestione dei capillari (punta di freccia rossa), edema polmonare (punta di freccia nera) e infiltrazione moderata di linfociti (freccie). (C) Numerose cellule infiammatorie (freccie) ed emorragia diffusa (punta di freccia). (D) Pochi linfociti disseminati.

DISCUSSIONE

Photobacterium damsela subsp. *damsela* è un batterio Gram-negativo ed un patogeno zoonotico emergente, noto per causare, sempre più frequentemente, infezioni in specie marine appartenenti a gruppi tassonomici differenti. I pesci, sia selvatici che d'allevamento, rappresentano gli ospiti primari del patogeno, isolato anche in molluschi, crostacei, cetacei e tartarughe marine. La principale via d'infezione è rappresentata dall'esposizione di ferite cutanee all'acqua salmastra o salata, che nell'uomo solitamente avvengono durante attività di pesca e la manipolazione di pesci, configurando l'infezione da *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* come una patologia a carattere occupazionale. Inoltre, sono documentati anche casi di infezione conseguenti al consumo di pesce e frutti di mare crudi, nonché, un caso di infezione ascendente delle vie urinarie (Caddia et al., 2022; Gouife et al., 2022). Tra i principali fattori di virulenza di *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* vi è la produzione di emolisine, in particolare la damselisina (Dly) e l'emolisina A (HlyApl), presenti unicamente nei ceppi dotati del plasmide pPHDD1, e l'emolisina cromosomiale HlyAch. Tali fattori sono responsabili del comune quadro anatomo-patologico associato all'infezione, caratterizzato da fenomeni necrotico-emorragici e sepsi (Alba et al., 2013; Rivas et al., 2013). Ad oggi, in letteratura non sono riportati casi di isolamento di *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* negli uccelli.

Il ritrovamento dell'esemplare di gazza marina si inserisce nell'ambito di un'irruzione migratoria atipica, avvenuta nell'inverno 2022/2023, verosimilmente causata da eventi meteorologici estremi nel Nord Atlantico. Tali condizioni potrebbero aver compromesso lo stato fisiologico degli animali migratori, direttamente o tramite la ridotta disponibilità alimentare, aggravata dalla scarsa qualità trofica delle acque mediterranee per questa specie (Balestrieri et al., 2023). Ciò giustificherebbe lo stato nutrizionale modesto con cui è stato ritrovato l'esemplare di gazza marina sulle coste di Bacoli. Questo quadro potrebbe aver favorito una maggiore suscettibilità all'infezione da parte di un patogeno opportunistico come *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. È noto che il riscaldamento delle acque marine amplifica la virulenza di *P. damsela* subsp. *damsela*, inducendo una maggiore espressione di geni associati alla patogenicità, alla motilità e al metabolismo (Matanza et al., 2020). Il Mar Mediterraneo, soggetto a un incremento termico superiore rispetto alla media globale (Zittis, 2024) rappresenta pertanto un ambiente favorevole alla proliferazione di questo batterio. Negli ultimi anni sono stati documentati diversi casi di infezione da parte di questa sottospecie in animali marini spiaggiati lungo le coste mediterranee. Tra questi si segnalano un esemplare di tursiope (*Tursiops truncatus*) affetto da polmonite piogranulomatosa (Morick et al., 2023) e una tartaruga liuto (*Dermodochelys coriacea*) deceduta per enterite fibrinonecrotizzante e sepsi (Oliver-Guimerà et al., 2019). Anche in Italia, diversi cetacei e tartarughe marine spiaggiati lungo le coste liguri sono risultati positivi a ceppi virulenti di *P. damsela* subsp. *damsela* (Alba et al., 2016; Battistini et al., 2024). Nel 2022 è stato inoltre segnalato il primo caso umano in Sardegna (Caddia et al., 2022). Questi dati non solo confermano la recente presenza della sottospecie nel bacino del Mediterraneo, ma evidenziano anche la capacità del microrganismo di superare i confini interspecifici, mantenendo inalterata la propria patogenicità e virulenza. Il quadro anatomo-patologico della gazza marina è compatibile con le lesioni riscontrate in altre specie colpite dall'infezione batterica, in particolare mammiferi marini (Morick et al., 2023), compatibili con meccanismi patogenetici condivisi. L'esemplare è stato trovato solo a pochi metri dalla costa. Considerando che questi uccelli si sono mostrati socievoli nei confronti dell'uomo e si nutrono di pesci che fanno parte anche della dieta umana, esiste il rischio che *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* possa essere veicolato dall'avifauna marina e che vi sia una potenziale esposizione dell'uomo all'infezione. Come sottolineato da Georgopoulou & Tsiouris (2008) infatti, gli uccelli migratori svolgono

un ruolo significativo nell'ecologia e nella circolazione dei patogeni e nella trasmissione di zoonosi, sia in qualità di portatori biologici che meccanici.

CONCLUSIONI

Questo studio documenta per la prima volta l'isolamento di *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in un uccello, e in particolare in una specie migratrice. Sebbene si tratti di un singolo caso, esso solleva interrogativi sul potenziale impatto di questo patogeno sulla fauna marina e sull'avifauna, così come sull'acquacoltura e sulla salute pubblica. I dati raccolti, uniti alle evidenze disponibili in letteratura, rafforzano l'ipotesi di un elevato potenziale zoonotico di *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, con potenziale ampliamento dello spettro d'ospite in risposta a cambiamenti ambientali. Inoltre, considerando il ruolo rilevante degli uccelli migratori nella circolazione e nella trasmissione di patogeni, tale caso richiama l'attenzione sulle potenziali implicazioni per la salute umana e della fauna selvatica. Pertanto, è essenziale promuovere un monitoraggio continuo, basato su un approccio interdisciplinare e multidisciplinare, volto a raccogliere dati epidemiologici più completi su *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* e a chiarire il ruolo degli uccelli sinantropi e selvatici come potenziali reservoir o vettori del patogeno. È quindi necessario un approccio proattivo al fine di prevenire future minacce emergenti, soprattutto in un contesto di rapidi cambiamenti climatici.

BIBLIOGRAFIA

1. Alba P, Caprioli A, Cocumelli C, Ianzano A, Donati V, Scholl F and A Battisti. (2016). A new multilocus sequence typing scheme and its application for the characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* associated with mortality in cetaceans. *Front. Microbiol.* 7: 1656.
2. Balestrieri R, Vento R, Viviano A, Mori E, Gili C and F Monti. (2023). Razorbills *Alca torda* in Italian seas: a massive irruption of historical relevance and role of social network monitoring. *Animals.* 13(4): 656.
3. Battistini R, Masotti C, Giorda F, Grattarola C, Peletto S, Testori C, Zoppi S, Berio E, Crescio MI, Pussini N, Serracca L and C Casalone. (2024). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in Stranded Cetaceans: A 6-Year Monitoring of the Ligurian Sea in Italy. *Animals.* 14(19): 2825.
4. Boutabia L, Mena M, Eddine Mederbal K, Aimene Boulaouad B, Ayyach K, Harzallah B and S Telailia. (2023). Recent and exceptional irruption of the razorbill *Alca torda* (Linnaeus, 1758) on the Algerian coastline. *Nat. Croat.* 32(1): 233-239.
5. Caddia G, Casu M, Dettori S, Urru R and B Paglietti. (2022). Wound infection caused by *Photobacterium damsela* in a man in Sardinia (the first case in Italy): a case report and review of literature. *Infect. Dis. Trop. Med.* 8 : e796.
6. Carboneras C. (1988). The auks in the western Mediterranean. *Ringing & Migration*, 9(1), 18-26.
7. Doyle JJ and JL Doyle. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus.* 12: 13-15.
8. Harrison P, Perrow MR and H Larsson. (2021). Seabirds: the new identification guide. Lynx Edicions, Barcelona.
9. Georgopoulou I and V Tsiouris. (2008). The potential role of migratory birds in the transmission of zoonoses. *Vet. Ital.* 44(4): 671-677.
10. Gouife M, Chen S, Huang K, Nawaz M, Jin S, Ma R and J Xie. (2022). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in mariculture. *Aquac. Int.* 30(3): 1453-1480.
11. Lavers JL, Jones IL and AW Diamond. (2007). Natal and breeding dispersal of Razorbills (*Alca torda*) in eastern North America. *Waterbirds.* 30(4): 588-594.

12. Matanza XM and CR Osorio. (2020). Exposure of the opportunistic marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* to human body temperature is a stressful condition that shapes the transcriptome, viability, cell morphology, and virulence. *Front. Microbiol.* 11: 1771.
13. Monti F, Mori E, Balestrieri R, Minichino A, Vento R, Viviano A and F Tiralongo. (2024). First data on the diet of Razorbill *Alca torda* wintering in the Mediterranean Sea: insights from social media. *Mediterr. Mar. Sci.* 25(1): 58-66.
14. Morick D, Blum SE, Davidovich N, Zemah-Shamir Z, Bigal E, Itay P and AP Scheinin. (2023). *Photobacterium damsela* subspecies *damsela* Pneumonia in Dead, Stranded Bottlenose Dolphin, Eastern Mediterranean Sea. *Emerg. Infecti. Dis.* 29(1): 179.
15. Oliver-Guimerà A, Abarca ML, Cuvertoret-Sanz M and M Domingo. (2019). Fatal *Photobacterium damsela*-induced enteritis in a leatherback turtle *Dermochelys coriacea*. *Dis. Aquat. Organ.* 135(2): 151-156.
16. Rivas AJ, Lemos ML and CR Osorio. (2013). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. *Front. Microbiol.* 4: 283.
17. Zittis G. (2024). The Mediterranean in the Face of the Climate Emergency and the Increase in Extreme Weather Events. IEMed Mediterranean Yearbook 2024, pp. 283-287.

DINAMICHE DI CIRCOLAZIONE ED EVOLUZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (aMPV) IN UN ALLEVAMENTO DI SVEZZAMENTO

Sartore P.¹, Legnardi M.², Poletto F.², Franzo G.², Tucciarone C.M.², Cecchinato M.²

¹*Veterinario settore avicolo;*

²*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università 16, Legnaro 35020, Italia*

Summary

Despite representing a marginal share of the national poultry production compared to intensive farming systems, rural poultry farms may nonetheless constitute a conducive environment for the persistence and dissemination of viral pathogens, due to suboptimal biosecurity standards and frequent interconnections among different holdings. The aim of the project was to evaluate the circulation of avian metapneumovirus (aMPV) within a multi-age, multi-species dealer farm located in the Veneto region.

Over the course of 5 months (January-May 2025), 10 rhinopharyngeal swabs were collected every 10 days from each group present in the farm. This longitudinal approach resulted in the collection of 130 pooled respiratory samples from 32 groups of chickens, 4 of guinea fowls, 3 of quails, 3 of ducks and a single group of pheasants. All samples were tested by RT-PCR to detect aMPV subtypes A and B. In addition, duck samples were subjected to a qRT-PCR assay for the specific identification of aMPV subtype C.

aMPV infection was detected in multiple avian species on the farm, including chickens, guinea fowls, and ducks. Out of 130 pooled samples tested, 35 (26.9%) were positive, corresponding to 22 out of 43 sampled groups (51.1%). All detections were attributed to aMPV/B besides one caused by aMPV/A, whereas aMPV/C was not found in any sample.

Based on these findings, rural dealer farms seem to potentially contribute to the spread and maintenance of aMPV and likewise of other viral pathogens. Although reports of clinical outbreaks or increased mortality were very limited according to the farm owner, such uncontrolled and prolonged circulation may promote the emergence of more virulent strains and the development of clinical disease under predisposing conditions such as co-infections with other pathogens or deteriorating environmental conditions.

INTRODUZIONE

Sostenuta da continui progressi tecnologici e da un crescente livello di integrazione, l'industria avicola rappresenta uno dei principali comparti produttivi a livello globale. Sebbene la sua espansione sia principalmente trainata dai sistemi intensivi, gli allevamenti rurali costituiscono ancora una componente produttiva rilevante anche nei Paesi industrializzati. Questo segmento si distingue per una marcata eterogeneità, includendo diverse tipologie di allevamento con finalità differenti (es. commercianti, svezzatori, hobbisti, ...) spesso caratterizzate da standard di biosicurezza, capacità diagnostiche e strategie di controllo delle malattie non comparabili a quelle delle aziende avicole intensive (Gentile et al., 2024). Di conseguenza, il loro potenziale ruolo nella dinamica epidemiologica delle malattie infettive risulta significativo, sebbene frequentemente sottostimato o non adeguatamente rilevato dai sistemi di sorveglianza messi in atto.

Il presente studio si è posto l'obiettivo di analizzare, attraverso un'indagine longitudinale condotta mediante tecniche di biologia molecolare, la presenza e la circolazione di metapneumovirus aviare (aMPV) all'interno di un allevamento di svezzamento, definito dalla normativa vigente come uno stabilimento in cui i volatili vengono allevati per una parte del ciclo produttivo, per poi essere destinati principalmente al circuito rurale (es. venduti a commercianti o ad allevamenti familiari) (D.M. 25/06/10).

aMPV è un patogeno a diffusione globale responsabile di un'infezione acuta e altamente contagiosa delle vie respiratorie superiori, talora accompagnata da disturbi riproduttivi, che colpisce prevalentemente tacchini, oltre a polli e anatre (WOAH, 2022). Tale virus viene suddiviso in 4 sottotipi (A, B, C, D) ognuno dei quali mostra una specifica affinità per ospiti differenti (Brown et al., 2019). Nonostante l'infezione possa non portare a manifestazioni cliniche (Suarez et al., 2020), la sua endemicità e la rapidità di trasmissione rendono aMPV uno dei patogeni respiratori che sta acquisendo più importanza all'interno del settore avicolo ed in particolare nel settore industriale (Tucciarone et al., 2024).

MATERIALI E METODI

L'azienda oggetto dello studio si trovava in Veneto e presentava un'organizzazione multi-specie e multi-età. Le specie allevate includevano polli (broiler e ovaiole), quaglie, anatre, fagiani e faraone. I broiler, le faraone e i fagiani provenivano direttamente dagli incubatoi, mentre le anatre potevano provenire anche da altri rivenditori, ma erano comunque introdotte nella prima settimana di vita. A seconda della domanda, i broiler erano talvolta acquistati anche in età più avanzata. Questi animali venivano allevati per periodi di tempo variabili, fino alla vendita a clienti privati o altri rivenditori. Le ovaiole e le quaglie erano invece acquistate principalmente per essere rivendute nell'arco di pochi giorni. Nell'allevamento oggetto di studio non veniva condotta alcuna vaccinazione nei confronti di aMPV.

L'allevamento era strutturato in due siti separati (denominati A e B), distanti circa 1 km. Il sito A comprendeva un capannone con sei stanze separate per i polli, recinti esterni per le anatre, il punto vendita e un macello aziendale. Il sito B era composto da due capannoni per i polli, uno con otto stanze e l'altro con cinque stanze con accesso esterno. Erano inoltre presenti recinti esterni per fagiani e faraone. Pulizia e disinfezione venivano effettuate ogni volta che un gruppo lasciava l'allevamento, mentre un periodo di "tutto pieno-tutto vuoto" della durata di circa 15 giorni veniva osservato una volta all'anno in ciascun sito con tempistiche differenti.

Lo studio ha avuto una durata di circa 5 mesi, da inizio gennaio 2024 a fine maggio 2024. Durante questo periodo è stato svolto un campionamento longitudinale a intervalli di circa 10 giorni, prelevando 10 tamponi rinofaringei da ciascun gruppo di animali presente in allevamento ad ogni momento di campionamento. Tali prelievi venivano effettuati anche ad ogni entrata o uscita di un gruppo che avvenisse in giorni non coincidenti con i punti di campionamento stabiliti. I tamponi di ciascun gruppo sono stati processati in *pool*, ognuno etichettato con un codice a due lettere corrispondente alla specie, seguito da due numeri progressivi che segnalavano il gruppo e il punto di campionamento, più una eventuale lettera progressiva finale per i sottogruppi creati spostando animali in recinti diversi.

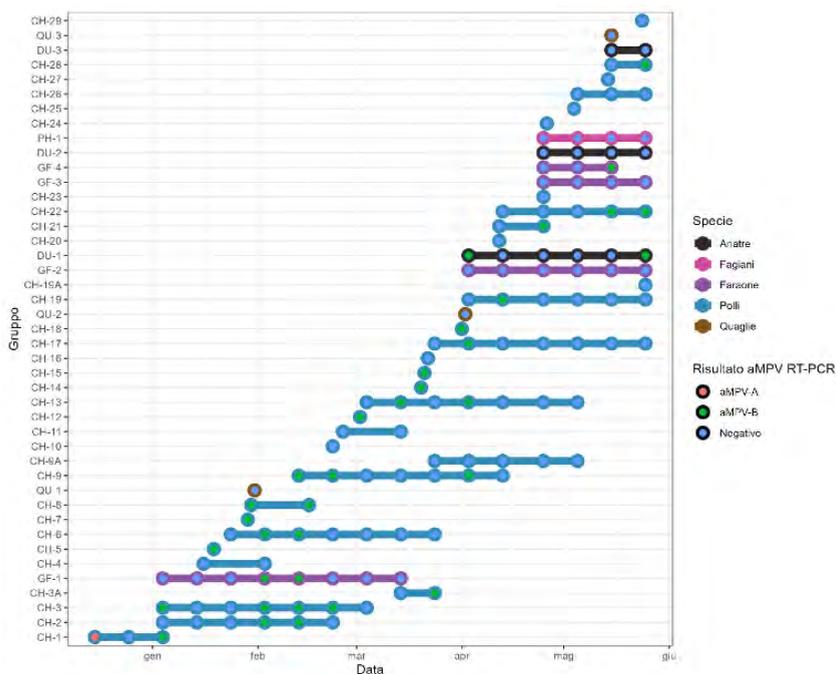
Dopo l'estrazione degli acidi nucleici, per la ricerca dei sottotipi A e B di aMPV è stata eseguita, su tutti i pool di campioni, una RT-PCR basata sui primer Gstart+e G6-

che permetteva l'amplificazione di una porzione del gene G di aMPV (Cecchinato et al., 2010). Parallelamente, sui pool di campioni prelevati dagli anatidi è stata eseguita una qRT-PCR basata sui primer aMPV/C Forward, aMPV/C Reverse e sulla sonda aMPV/C Probe disegnati da Tucciarone et al. (2022) per la rilevazione specifica del sottotipo C di aMPV.

I campioni positivi alla RT-PCR sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger, I cromatogrammi sono stati poi ispezionati e rifiniti con FinchTV (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA) e le sequenze consenso sono state generate con ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Australia). Dopo aver allineato le sequenze con metodo MUSCLE, le analisi filogenetiche sono state condotte con MEGA X (Kumar et al., 2018) utilizzando l'approccio di *Maximum Likelihood* con 1000 replicati e applicando il modello di sostituzione con il valore più basso in termini di *Bayesian Information Criterion* (BIC).

RISULTATI

Durante lo studio sono stati raccolti 130 campioni da 43 gruppi (32 di polli, 4 di faraone, 3 di quaglie, 3 di anatre e 1 di fagiani). Un totale di 35 campioni (26,9%) prelevati da 22 gruppi (51,1%) sono risultati positivi alla RT-PCR per la ricerca dei sottotipi A e B. Entrambi i sottotipi sono stati rilevati; tuttavia, aMPV/A è stato individuato una sola volta, esclusivamente in un pool preliminare, mentre aMPV/B è stato riscontrato lungo l'intero periodo di campionamento, con frequenti positività ricorrenti negli stessi gruppi (Figura 1). La ricerca del sottotipo aMPV/C, condotta unicamente su tre gruppi



di anatre, non ha evidenziato alcuna positività.

Figura 1. Sequenza temporale delle positività per aMPV.

DISCUSSIONE

Lo studio eseguito ha evidenziato una diffusa circolazione di aMPV/B nell'allevamento considerato, con positività rilevate in diverse specie aviarie, tra cui polli, faraone e anatre. Questo risultato era sicuramente atteso in quanto, in Italia, aMPV/B risulta largamente predominante (Franzo et al., 2020; Tucciarone et al., 2018). Tuttavia, un dato di particolare interesse è il ritrovamento di aMPV/B negli anatidi, poiché esso contrasta con l'attuale conoscenza sul tropismo d'ospite di questo sottotipo (Brown et al., 2019). Dalle analisi filogenetiche è emerso che i ceppi identificati erano perlopiù omogenei e riconducibili principalmente a virus di campo. Alcune sequenze sono risultate geneticamente vicine a ceppi vaccinali, sebbene non fossero state somministrate vaccinazioni nei confronti di aMPV né nell'allevamento né prima dell'acquisto dei gruppi di animali campionati durante il periodo di studio. Anche il singolo ceppo di aMPV/A ritrovato era identico al ceppo vaccinale 8544, il quale non è nemmeno commercializzato in Italia. Tali risultati suggeriscono che i ceppi vaccinali siano stati introdotti da fonti esterne (animali commercianti, persone, ...), sebbene la limitata variabilità genetica osservata e la possibilità che ceppi originariamente vaccinali possano acquisire mutazioni durante la loro circolazione rende tali conclusioni speculative.

Dal punto di vista della circolazione virale, non è emersa alcuna separazione tra i due siti aziendali in termini di ceppi circolanti, indicando che le misure di biosicurezza non sono state sufficienti a impedire la diffusione intra-aziendale, probabilmente a causa dei frequenti spostamenti di animali e mezzi tra i due siti. Tuttavia, un calo nel numero di rilevamenti è stato registrato in seguito all'applicazione della pratica del "tutto pieno-tutto vuoto" nel sito B (14 marzo – 3 aprile 2024), suggerendo un'efficacia almeno parziale di tale intervento nel contenimento della circolazione virale. Nonostante la costante presenza di virus di campo all'interno dell'allevamento, l'allevatore non ha riportato particolari episodi clinici o aumenti di mortalità durante il periodo di studio. L'impatto di aMPV potrebbe quindi essere stato mitigato dall'utilizzo di razze a lenta crescita e dalle basse densità di allevamento. Tuttavia, la sua circolazione impone comunque attenzione, in quanto può predisporre all'emergere di stipiti più virulenti e all'insorgere di forme cliniche in presenza di condizioni predisponenti quali coinfezioni con altri patogeni, rotture vaccinali o peggioramento delle condizioni ambientali.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti confermano la presenza del virus nel comparto avicolo rurale, suggerendo un possibile ruolo di questo settore nel mantenimento e nella diffusione dell'infezione. In particolare, la rilevazione del sottotipo B in specie aviarie non comunemente associate a tale variante evidenzia la presenza di dinamiche epidemiologiche ancora poco comprese, ma potenzialmente rilevanti. La struttura tipicamente multispecie e multietà degli allevamenti di svezzamento potrebbe inoltre facilitare la persistenza e la trasmissione del virus, aumentando il rischio di diffusione su scala più ampia. Tali evidenze sottolineano l'importanza di rafforzare le misure di biosicurezza e di attuare sistemi di sorveglianza regolari anche nel settore rurale, al fine di contenere l'eventuale impatto sanitario ed epidemiologico di aMPV.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown PA, Allée C, Courtillon C, Szerman N, Lemaitre E, Toquin D, Mangart J-M, Amelot M and N Eterradossi. (2019). Host specificity of avian metapneumoviruses. *Avian Pathol.* 48:311–318.
2. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Vet. Microbiol.* 146:24–34.
3. Decreto Ministeriale 25/06/10. Accessibile presso <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2010/08/23/10A10245/sg>.
4. Franzo G, Legnardi M, Mescolini G, Tucciarone CM, Lupini C, Quaglia G, Catelli E and M Cecchinato. (2020). Avian Metapneumovirus subtype B around Europe: a phylodynamic reconstruction. *Vet. Res.* 51:88.
5. Gentile N, Carrasquer F, Marco-Fuertes A and C Marin. (2024). Backyard poultry: exploring non-intensive production systems. *Poult. Sci.* 103:103284.
6. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
7. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549.
8. 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 (pp. 109–166). 14th Edition.*
9. Tucciarone CM, Franzo G, Legnardi M, Pasotto D, Lupini C, Catelli E, Quaglia G, Graziosi G, Dal Molin E, Gobbo F and M Cecchinato. (2022). Molecular Survey on A, B, C and New Avian Metapneumovirus (aMPV) Subtypes in Wild Birds of Northern-Central Italy. *Vet. Sci.* 9:373.
10. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Alejo CT, Listorti V, Mescolini G, Brandão PE, Martini M, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97:503–509.
11. Tucciarone CM, Legnardi M, Cecchinato M, Franzo G, Poletto F, Miccio L, Busquet M, Carceller E, Dardi M, Solé M and D Pasotto. (2024). Research note: Indirect evidence of avian Metapneumovirus circulation in broilers in Italy. *Poult. Sci.* 103(11)
12. WOA. (2022). Turkey rinotracheitis (avian metapneumovirus infections). In: *WOAH Terrestrial Manual.*

ANALISI MLST DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN ALLEVAMENTI ITALIANI: DINAMICHE DI DIFFUSIONE E TRASMISSIONE IN 14 ANNI DI OSSERVAZIONI

Stefani E.¹, Morales-Arce A.Y.¹, Nai G.¹, Righetti V.¹, Gastaldelli M.¹, Colò B.¹, Prativiera D.¹, Giacomelli M.¹, Catania S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCTL Verona, via Bovolino 1C, 37060 Verona (VR), Italia.

Summary

Mycoplasma synoviae (*M. synoviae*) is a significant poultry pathogen causing respiratory disease, synovitis, and Egg Apex Abnormalities (EAA), leading to substantial industrial economic losses. Northern Italy is a Densely Populated Poultry Area (DPPA) of industrial and backyard poultry farms providing a unique setting to study *M. synoviae* dynamics, particularly given the integrated production model, where companies manage geographically dispersed farms with shared logistics. Using *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), we analyzed 227 *M. synoviae* Italian samples collected from industrial and backyard poultry farms between 2010 and 2024. Our findings reveal high genetic diversity, with 99 distinct Sequence Type (ST) identified, 95 of which were novel. Strains clustered into 12 clonal complexes, with widespread ST detected across multiple regions, indicating broad dissemination. Notably, transmission patterns were strongly linked to integrated poultry production networks rather than geographic proximity. Farms within the same production chain frequently shared identical ST, even when located hundreds of kilometers apart, highlighting the role of shared logistics (transport, personnel, equipment) in pathogen spread.

In contrast, backyard farms showed minimal epidemiological connectivity with industrial systems. Only 4 STs of 44 detected in Veneto were shared between sectors, suggesting independent transmission cycles.

The study underscores that *M. synoviae* spread in Italy is driven primarily by modern, high-density poultry production systems, which facilitate rapid transmission and genetic diversification of the pathogen. To mitigate risks, targeted surveillance within integrated chains is critical for early outbreak detection, reduced antibiotic reliance, and sustainable disease management. These insights are vital for shaping biosecurity policies in an era of expanding global poultry demand.

INTRODUZIONE

Mycoplasma synoviae (*M. synoviae*) è un microrganismo considerato patogeno e possibile causa di importanti perdite economiche nell'industria avicola. Può trasmettersi sia per via verticale dai riproduttori alla progenie, che orizzontale tra individui dello stesso allevamento e diversi allevamenti. *M. synoviae* causa sinusite e forme respiratorie principalmente in polli e tacchini, nelle galline ovaiole può anche dare origine all'anormalità dell'apice dell'uovo (EAA) con conseguenti perdite economiche (Catania et al., 2010). L'incidenza di *Mycoplasma synoviae*, è strettamente legata ai sistemi di produzione intensivi che aumentano

il rischio di esposizione e trasmissione. L'Italia settentrionale è una zona ad elevata densità avicola in cui sono concentrati numerosi allevamenti industriali e rurali in un'area geografica ristretta. Gli allevamenti industriali operano spesso attraverso un sistema integrato, in cui una singola filiera controlla tutte le fasi di produzione coinvolgendo più aziende, talvolta situate a notevole distanza tra loro, ma che condividono mezzi di trasporto, personale e attrezzature. Inoltre, negli allevamenti industriali vengono utilizzate poche razze commerciali selezionate, come Ross 308 per i polli da carne, Hy-Line o Lohmann per le galline ovaiole, e B.U.T. 6 o Hybrid Converter NOVO per i tacchini. Al contrario, gli allevamenti rurali presentano meno di 50 capi con una maggiore diversità genetica e di specie e i proprietari solitamente sono singoli individui. Il controllo della diffusione di *M. synoviae* implica l'implementazione di misure di biosicurezza, la vaccinazione, il trattamento antibiotico e l'uso di programmi di controllo utilizzando marker molecolari, tecniche sierologiche e la tipizzazione molecolare dei ceppi circolanti. Questo tipo di misure viene utilizzato molto di più negli allevamenti industriali rispetto a quelli rurali che potrebbero quindi veicolare la trasmissione di *M. synoviae*. L'identificazione genetica dei ceppi circolanti è un ottimo strumento per tracciare e seguire la diffusione di questo patogeno. Il metodo di identificazione molecolare più utilizzato per studiare la distribuzione geografica di *M. synoviae* è il *Multi Locus Sequence Typing* (MLST). Questo metodo è basato sull'amplificazione e il sequenziamento di sette geni *housekeeping* (*adk*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*), l'assegnazione di un numero univoco ad ogni sequenza allelica trovata e l'assegnazione di un *Sequence Type* (ST) numerico basato sulla combinazione allelica identificata che caratterizza il ceppo di *M. synoviae* analizzato. Tutto questo è possibile grazie alla disponibilità di un database pubblico (*PubMLST*) in cui si possono analizzare le sequenze e condividere in maniera univoca eventuali nuovi profili genetici identificati. In questo studio, il metodo MLST è stato utilizzato per la prima volta in Italia, analizzando 181 ceppi industriali e 46 rurali isolati tra il 2010 e il 2024. L'obiettivo era valutare se la trasmissione del patogeno fosse influenzata dalla vicinanza geografica degli allevamenti, dall'appartenenza delle aziende alla stessa filiera e di esaminare il ruolo degli allevamenti rurali nella diffusione. I risultati hanno dimostrato che gli ST sono più frequentemente condivisi tra allevamenti della stessa filiera piuttosto che tra quelli della stessa regione. Inoltre, non risultano particolari evidenze di condivisione di genotipi tra allevamenti industriali e rurali.

MATERIALI E METODI

Selezione dei campioni

Abbiamo analizzato 227 isolati italiani di *M. synoviae* raccolti tra il 2010 e giugno 2024 da polli (n = 176), tacchini (n = 44), faraone (n = 4), pernici (n = 1), oche (n = 1) e fagiani (n = 1). Oltre l'80% dei prelievi (n = 181) è di origine industriali, mentre il restante (n = 46) deriva da allevamenti rurali. I campioni sono stati raccolti in diverse regioni italiane: Veneto (n = 92), Emilia-Romagna (n = 69), Lombardia (n = 15), Friuli Venezia Giulia (n = 5), Trentino-Alto Adige (n = 4), Piemonte (n = 3), Abruzzo (n = 12), Marche (n = 6), Molise (n = 3), Sicilia (n = 9), Toscana (n = 4) e Umbria (n = 2). Circa il 90% dei campioni da allevamenti rurali (n = 41) è stato raccolto nella regione Veneto tra il 2010 e il 2021. I cam-

pioni di origine industriale derivano principalmente da tre filiere (denominate A, B e C), costituite da diversi allevamenti ubicati in varie regioni: 38 campioni dalla filiera A, 53 dalla B e 37 dalla C. I rimanenti 53 campioni provenivano da altri allevamenti industriali minori.

Estrazione del DNA

Il DNA genomico dei ceppi di *M. synoviae* selezionati è stato estratto utilizzando il kit MagMAX™ Pathogen DNA/RNA kit (Applied Biosystems) seguendo le istruzioni del produttore.

M. synoviae MLST

Per eseguire l'analisi MLST sono stati amplificati 7 geni housekeeping (*adhA*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa*, *recA*) utilizzando le coppie di *primer* descritte da El-Gazzar et al. (2017). L'amplificazione è stata eseguita con il kit qPCR Sybr Fast Universal (Merck) utilizzando lo strumento CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System. Il protocollo di amplificazione prevede uno *step* a 95°C per 5' seguito da 35 cicli a 95°C per 1', 54°C per 30" e 72°C per 1,30'.

Minimum spanning tree

Le relazioni tra i ceppi sono state valutate mediante la costruzione di *Minimum Spanning Tree* (MST) con il software *Bionumerics v7.6* (Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgio). I ceppi sono stati raggruppati in complessi clonali, in cui ciascun genotipo condivide almeno 6 loci su 7 con almeno un altro membro del gruppo. Il MST è stato successivamente elaborato con *Adobe Illustrator* per una migliore resa visiva.

RISULTATI

In questo studio, abbiamo analizzato 227 isolati italiani di *M. synoviae* raccolti dal 2010 al 2024 in allevamenti di tre filiere avicole (A, B e C), in allevamenti industriali minori (D) e in rurali utilizzando la tecnica MLST. Gli isolati sono stati classificati in 99 ST, indicando un'elevata diversità genetica. Sono stati identificati 95 nuovi ST, attribuibili a sequenze alleliche nuove o a nuove combinazioni. Gli isolati sono stati raggruppati in 12 *Clonal Complex* (CC), mentre 41 isolati sono rimasti singoli (*singleton*) (Figura 1).

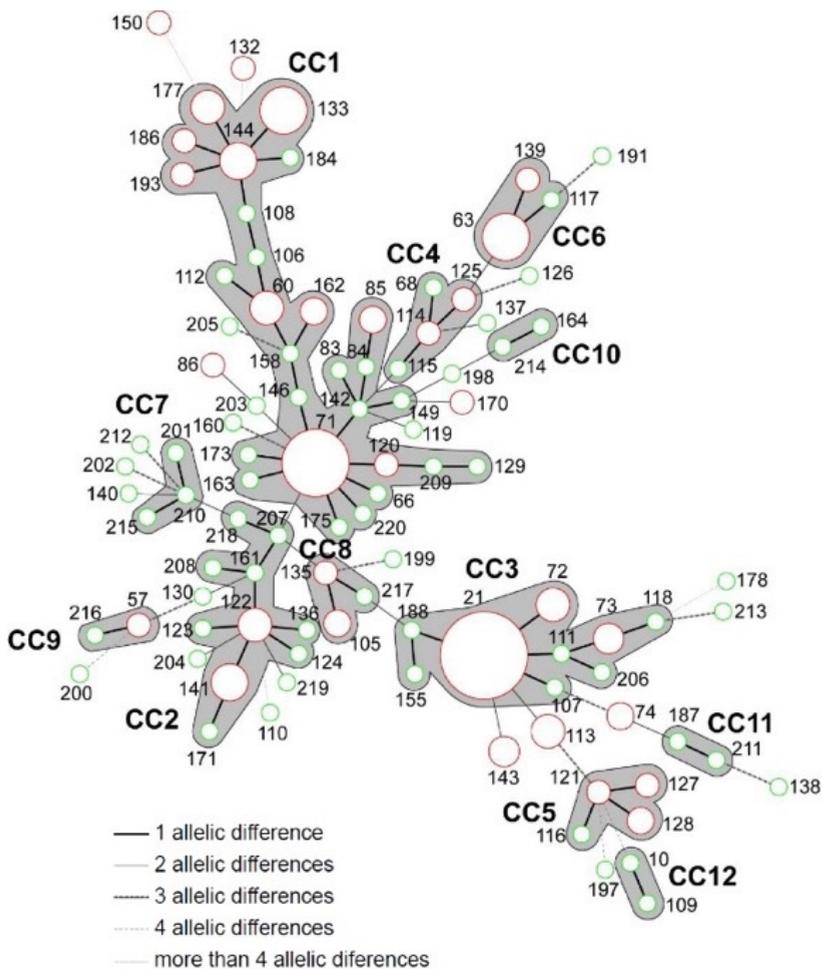


Figura 1. *Minimum spanning tree* (MST) che indica le relazioni tra ST dei campioni di *M. synoviae*. Ogni cerchio con il relativo numero corrisponde ad un ST. Lo stile delle linee che collegano i cerchi indicano le differenze alleliche tra ST. Le zone colorate di grigio indicano i CC. Il colore dei cerchi indica: rosso ST ritrovato in più di un isolato, verde ST ritrovato in un solo isolato.

La maggior parte degli isolati si raggruppa negli stessi CC indipendentemente dall'origine geografica. Inoltre, tanto più frequentemente un ST viene isolato tante più regioni tende a comprendere (ST21, ST71 e ST63) (Tabella 1).

Tabella 1. Regione di provenienza degli ST ritrovati in più di un isolato

<i>Clonal complex</i>	ST	Regione
1	60	Emilia Romagna, Veneto
	71	Emilia Romagna, Veneto, Toscana, Sicilia, Lombardia, Trentino-Alto Adige, Friuli-Venezia-Giulia, Molise
	85	Emilia Romagna, Veneto
	120	Lombardia, Piemonte
	133	Piemonte, Veneto, Lombardia
	144	Emilia Romagna, Veneto
	162	Abruzzo, Umbria
	177	Emilia Romagna, Lombardia
	186	Veneto
	193	Emilia Romagna
2	141	Abruzzo, Emilia Romagna
	122	Molise, Veneto
3	21	Emilia Romagna, Friuli-Venezia-Giulia, Lombardia, Sicilia, Veneto
	72	Emilia Romagna, Marche, Veneto
	73	Emilia Romagna, Friuli-Venezia-Giulia, Veneto
4	114	Sicilia, Veneto
	125	Lombardia, Sicilia
5	128	Veneto
		Emilia Romagna
	127	Abruzzo
6	63	Abruzzo, Emilia Romagna, Lombardia, Marche, Trentino-Alto Adige, Umbria, Veneto
	139	Veneto
8	105	Emilia Romagna, Veneto
	135	Veneto
9	57	Veneto
SINGLETON	74	Friuli-Venezia-Giulia, Veneto
SINGLETON	86	Veneto
SINGLETON	113	Lombardia, Marche, Veneto
SINGLETON	132	Veneto
SINGLETON	143	Emilia Romagna, Piemonte, Veneto
SINGLETON	170	Abruzzo, Emilia Romagna

Gli isolati raccolti dagli allevamenti industriali legati alle filiere sono stati analizzati valutando la loro distribuzione nel tempo. Nello stesso anno, differenti allevamenti appartenenti alla stessa filiera condividono lo stesso ST. Alcuni di questi allevamenti sono situati nella stessa regione, ma alcuni sono situati in regioni differenti a molti chilometri di distanza, suggerendo che la diffusione di *M. synoviae* venga veicolata maggiormente dalla condivisione di mezzi di trasporto e fomiti che dalla vicinanza degli allevamenti.

Per valutare se il settore rurale potesse fungere da serbatoio per *M. synoviae* e favorire la diffusione verso il settore industriale, abbiamo valutato gli ST dei campioni industriali e rurali raccolti nella regione Veneto per un arco temporale di 11 anni (2010-2021). Abbiamo identificato 44 ST, 19 ritrovati solo in allevamenti rurali, 16 solo in campioni di provenienza industriale e solo 9 condivisi tra i due settori. Come evidenziato nella Figura 2, solo in 4 casi (ST21, ST72, ST122 e ST139) gli allevamenti industriali e quelli rurali hanno presentato uguale ST nello stesso anno, suggerendo la persistenza dello stesso ceppo di *M. synoviae* nella regione.

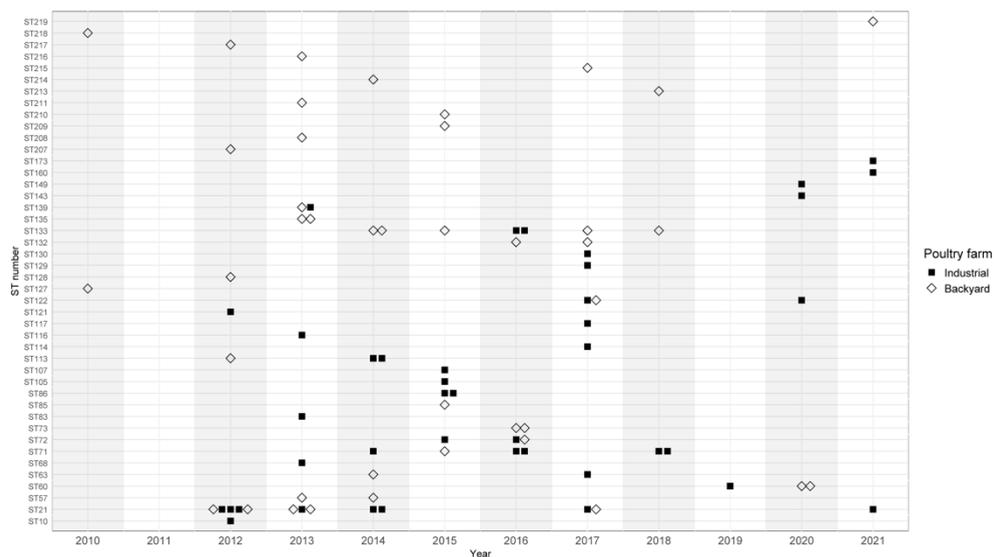


Figura 2: Distribuzione temporale degli ST rilevati in Veneto suddivisi per settore di provenienza. Il cerchio indica il settore industriale mentre il triangolo indica quello rurale.

DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo condotto la prima valutazione della diversità genetica e diffusione di *M. synoviae* negli allevamenti avicoli industriali e tra settore industriale e rurale in Italia. Abbiamo impiegato il metodo MLST come strumento epidemiologico per analizzare gli isolati di *M. synoviae*, tracciando la ricorrenza del patogeno in un periodo di 14 anni. Abbiamo inoltre esaminato l'influenza della

prossimità geografica sulla sua diffusione all'interno degli allevamenti industriali e tra contesti industriali e rurali. I nostri risultati rivelano un elevato livello di diversità genetica di *M. synoviae*, con 99 ST distinti, di cui 95 rinvenuti esclusivamente in Italia. Questa variabilità sottolinea l'evoluzione continua di *M. synoviae* e la sua capacità di generare nuove combinazioni genetiche attraverso mutazione, ricombinazione e selezione come già riportato per la specie *Mycoplasma* (Hakim et al., 2021; Sui et al., 2022).

Per valutare se la prossimità geografica potesse influenzare la diffusione di *M. synoviae* siamo andati a valutare la ricorrenza degli ST a livello regionale. Ceppi con lo stesso ST ma isolati in regioni differenti suggeriscono l'assenza di una chiara correlazione tra gli ST dei ceppi di *M. synoviae* e la loro origine geografica. Al contrario, gli isolati provenienti da allevamenti collegati alla stessa filiera hanno mostrato, nello stesso anno, ST identici (ST21, ST63, ST 162, ST170 e ST171) nonostante la loro ampia dispersione geografica. Questa condivisione di ST tra allevamenti appartenenti alla stessa filiera dimostra che la diffusione di *M. synoviae* è principalmente guidata dalla logistica del sistema integrato piuttosto che essere influenzata dalla prossimità geografica.

In letteratura è stato suggerito che gli allevamenti rurali possano fungere da serbatoi per malattie respiratorie (Derksen et al., 2018; Felice et al., 2020) ma, i nostri dati indicano che nella regione Veneto la trasmissione tra i due settori è limitata. Infatti, solo 4 ST sono stati condivisi tra i due settori indicando un'interazione epidemiologica limitata. Il fatto che molti ST siano stati ritrovati solo in un settore e non si siano sovrapposti nel tempo implica che questi due sistemi produttivi avicoli abbiano limitate interazioni tra loro. Questi due tipi di allevamento avicolo funzionano probabilmente come serbatoi indipendenti.

CONCLUSIONI

In conclusione, il nostro studio rivela che la diffusione di *M. synoviae* in Italia sembrerebbe essere alimentata principalmente dal sistema avicolo integrato. Questa interconnessione costante, attraverso lo scambio di mezzi di trasporto, personale e fomite, crea un ambiente ideale per la rapida trasmissione del patogeno tra le diverse unità produttive. Le caratteristiche di adattabilità di *M. synoviae* congiuntamente alle condizioni create dal sistema avicolo integrato possono favorire lo sviluppo di nuovi genotipi sempre più adatti al sistema avicolo moderno. Su tali basi è quindi fondamentale strutturare programmi di sorveglianza mirati principalmente ai sistemi avicoli integrati, considerando che la domanda interna, ma anche globale, di carne avicola continua a spingere l'espansione di modelli produttivi su larga scala e ad alta densità. Un monitoraggio specifico all'interno di questo sistema produttivo sarà cruciale per l'individuazione precoce e il controllo dei focolai, e per comprendere meglio come poter trovare soluzioni finalizzate a ridurre l'impatto sull'efficienza produttiva. Sarà necessario promuovere anche pratiche più sostenibili attraverso una migliore gestione delle malattie, una minore dipendenza dagli antibiotici e, di conseguenza, un ridotto rischio di sviluppo di resistenze.

BILIOGRAFIA

1. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L and RAJ Nicholas. (2010). Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 54: 961-964.
2. Derksen T, Lampron R, Hauck R, Pitesky M and RA Gallardo. (2018). Biosecurity assessment and seroprevalence of respiratory diseases in backyard poultry flocks located close to and far from commercial premises. *Avian Dis.* 62: 1-5.
3. El-Gazzar M, Ghanem M, McDonald K, Ferguson-Noel N, Raviv Z and RD Slemons. (2017). Development of multilocus sequence typing (MLST) for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 61: 25-32.
4. Felice V, Lupini C, Mescolini G, Silveira F, Guerrini A, Catelli E and A Di Francesco. (2020). Molecular detection and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* strains in backyard poultry in Italy. *Poult. Sci.* 99: 719-724.
5. Hakim MS, Annisa L, Jariah ROA and C Vink. (2021). The mechanisms underlying antigenic variation and maintenance of genomic integrity in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Arch. Microbiol.* 203(2): 413-429.
6. Sui C, Cui H, Ji J, Xu X, Kan Y, Yao L, Bi Y, Zhang X and Q Xie. (2022). Epidemiological investigations and locally determined genotype diversity of *Mycoplasma synoviae* in Central China from 2017 to 2019. *Poult. Sci.* 101: 101522.

RUOLO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NEL MANTENIMENTO DEL BOTULISMO AVIARE IN GRUPPI DI OVAIOLE COMMERCIALI

Zandonà L.¹, Garbuio M.¹, Guolo A.¹, Drigo I.¹, Moschioni C.¹, Harper V.², Anniballi F.³, Scalfaro C.³, Taglieri S.³, Bano L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT2 sezione di Treviso, Vicolo Giuseppe Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba (TV), Italia;

² Medico veterinario libero professionista settore avicolo, Italia;

³ Centro di Riferimento Nazionale per il Botulismo, Istituto Superiore di Sanità, Via-
le Regina Elena 299, 00161 Roma, Italia

Summary

Avian botulism is a fatal disease that causes high mortality rates in wild birds worldwide and occasionally affects poultry flocks. This study investigates the potential role of red mites (*Dermanyssus gallinae*) in the recurrence of botulism outbreaks in laying hen flocks between different production cycles. An avian botulism outbreak was diagnosed in a laying hen flock on a multi-unit farm. In order to evaluate potential mechanisms of persistence of botulinum neurotoxin (BoNT)-producing *Clostridia* in the farm environment, we tested feed, drinking water, and red mites caught in traps across different units. Red mites were frozen and washed with sporicidal disinfectants to avoid external contamination and ascertain the presence of the pathogen within the mites. While feed and drinking water tested negative, red mites were found to harbor *Clostridia* producing botulinum neurotoxin (BoNT) type C/D, the same type detected in the affected flocks. In order to evaluate epidemiological links, MLVA analysis was performed on positive samples, revealing the same genetic profile in both red mites and laying hens. To our knowledge, this is the first evidence of BoNT-producing *Clostridia* in red mites. These results imply a potential involvement of red mites in the sustained presence of botulism within laying hen flocks and prompt further investigation into the occurrence of wound botulism as a possible new botulism form in laying hens.

INTRODUZIONE

Il botulismo aviare è una grave malattia che colpisce gli uccelli selvatici e il pollame allevato e che spesso può presentarsi con andamento epidemico. L'ingestione di neurotossine botuliniche (BoNTs) preformate (forma tossica) e/o la produzione di BoNTs da parte di alcune specie clostridiche nell'intestino (forma tossico-infettiva) sono la causa della paralisi flaccida che si osserva negli animali colpiti. Si conoscono 7 sierotipi diversi di BoNT (A-G) e il sierotipo riscontrato più frequentemente negli uccelli è rappresentato dalla forma mosaico C/D, sebbene non manchino casi sostenuti dai sierotipi A, E e D (Bouliane e Uzal, 2013, Zandonà et al., 2023). L'elevata mortalità e il calo di ovodeposizione hanno un notevole impatto economico sui gruppi di galline ovaiole mentre gli interrogativi di sicurezza alimentare sembrerebbero non trovare fondamento (Cordioli et al., 2024).

Alla comparsa della malattia si interviene solitamente in emergenza somministrando antimicrobici consentiti per i quali si conosce l'efficacia *in vitro*, ma il ripresentarsi della malattia in cicli successivi suggerisce indagini epidemiologiche approfondite

per prevenire le recidive. Il ruolo dell'acaro rosso *Dermanyssus gallinae* nel mantenimento di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e alcuni virus è noto ma non è mai stato indagato in episodi di botulismo (Cocciolo et al., 2020; Tomley e Sparagano, 2018; Valente Moro et al., 2009). Con questo lavoro si vogliono investigare le possibili cause di recidiva di botulismo aviare in un allevamento di ovaiole.

MATERIALI E METODI

Campionamento

In un allevamento di circa 900.000 ovaiole dal 2021 sono stati osservati casi ricorrenti di botulismo aviare in diversi gruppi multi-età ospitati in 9 capannoni (Cordioli et al., 2024). Per approfondire gli aspetti epidemiologici che possono aver contribuito all'introduzione e/o al mantenimento della malattia negli stessi ambienti di allevamento, sono stati condotti dei campionamenti in 4 diversi momenti in 4 capannoni diversi ospitanti gruppi affetti dalla malattia (capannoni identificati con lettere da "A" a "D"). Il primo campionamento è stato eseguito nel gruppo del capannone "A" a febbraio 2024 da mangime raccolto dalla mangiatoia e dall'acqua della linea di condotta prima dell'ingresso in capannone. Il secondo campionamento è stato effettuato a marzo 2024 sui gruppi ospitati nei capannoni A, B, C, D prelevando campioni di mangime direttamente dai silos di stoccaggio. Il terzo e quarto campionamento ha riguardato acari rossi catturati mediante l'apposizione di trappole (Red Mite Monitoring Kit, Albors Animal Health and Welfare, Milano, Italia) lasciate per 48 ore in diversi punti dei capannoni ospitanti i gruppi colpiti. Questi campionamenti sono stati eseguiti nei mesi di aprile 2024 (capannone A) e giugno 2024 (capannoni A e B).

Ricerca clostridi produttori di neurotossine botuliniche

I campioni di mangime sono stati preventivamente miscelati mentre l'acqua di abbeverata è stata centrifugata e raccolto il pellet sul fondo delle provette in modo tale da concentrare il materiale organico presente, incluse eventuali spore batteriche. Dai 20 ai 50 grammi di acari catturati per gruppo, sono stati dapprima congelati a -20°C per una settimana e successivamente lavati per 3 volte in etanolo 70% per 10 minuti ciascuno, seguiti da risciacquo con acqua deionizzata sterile in modo tale da allontanare la microflora batterica dalla superficie esterna dei parassiti (Binetruy et al., 2019).

Un grammo di acari è stato introdotto in 9 mL di terreno Fortified Cooked Meat Medium (FCMM), sottoposto a shock termico (71°C per 10 minuti seguito da raffreddamento rapido) e quindi incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi (Bano et al., 2015). I brodi colturali sono stati testati mediante test di biologia molecolari specifici per la rilevazione dei geni codificanti BoNTs dei sierotipi da A ad F e le varianti mosaico C/D e D/C (Anniballi et al., 2013, Centro Nazionale di Referenza sul Botulismo, CNRB, 2023; Cordioli et al., 2024).

I campioni risultati positivi sono stati sottoposti ad isolamento colturale, come descritto in letteratura (Bano et al., 2015).

Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

La metodica MLVA è una tecnica rapida che permette di caratterizzare i patogeni partendo da piccole quantità di DNA ed è stata largamente impiegata per indagini di epidemiologia molecolare in focolai di malattia sostenuta da diversi agenti patogeni batterici (Van Belkum, 2007).

DNA risultato positivo per geni codificanti BoNTs, è stato inviato presso ISS di Roma per l'esecuzione dell'analisi MLVA. L'MLVA è stata eseguita saggiando 9 diversi marcatori genetici specifici per i clostridi produttori di tossine botuliniche appartenenti al gruppo metabolico III distribuiti sia nel genoma che negli elementi genetici mobili di questi microrganismi, come descritto in letteratura (Souillard et al., 2021).

RISULTATI

Dai risultati raccolti (Tabella 1) emerge come il mangime presente nelle mangiatoie di gruppi affetti da botulismo possa venire contaminato e potrebbe fungere da amplificatore all'interno del gruppo. Gli accertamenti sui campioni di mangime e acqua prima della loro introduzione negli ambienti di allevamento, portano ad escludere queste matrici quali fonte di malattia.

Vista la negatività riscontrata in acqua e mangime, le indagini epidemiologiche si sono concentrate sugli acari rossi che sono risultati positivi nel capannone A, prelevati in 2 momenti diversi. Il profilo MLVA del ceppo isolato da animali malati dello stesso capannone è risultato identico a quello riscontrato nel campione di acari positivo.

Tabella 1. Riassunto delle analisi eseguite su differenti matrici prelevati da diversi gruppi di galline ovaiole presenti in azienda

Data	Materiale	Capannone	PCR RT	Colturale
Febbraio 2024	Mangime da mangiatoia	A	BoNT/CD	Pos
Febbraio 2024	Acqua di bevanda	A	Neg	-
Marzo 2024	Mangime da silos	A	Neg	-
Marzo 2024	Mangime da silos	B	Neg	-
Marzo 2024	Mangime da silos	C	Neg	-
Marzo 2024	Mangime da silos	D	Neg	-
Aprile 2024	Acaro rosso	A	BoNT/CD	Neg
Giugno 2024	Acaro rosso	A	BoNT/CD	neg
Giugno 2024	Acaro rosso	B	Neg	-

DISCUSSIONE

L'infestazione di acaro rosso rappresenta una delle maggiori sfide dell'allevamento moderno di ovaiole a livello mondiale causando gravi perdite economiche (Tomley e Sparagano, 2018). Il parassita è riconosciuto vettore di diversi agenti patogeni, tra cui *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli*, e influenza aviaria (Valiente Moro et al., 2009, Coccio et al., 2020). I risultati di questo lavoro dimostrano un ruolo attivo di *Dermanyssus gallinae* anche come veicolo di Clostridi produttori di neurotossine botuliniche suggerendo un loro possibile ruolo nel mantenimento dell'infezione in ambiente d'allevamento. Il protocollo di lavaggio esterno applicato, tuttavia, non permette di affermare con certezza che i Clostridi BoNT-produttori fossero all'interno del parassita. Infatti, il trattamento con etanolo

70%, sebbene impiegato in vari studi di metagenomica su aracnidi, non garantisce un'azione sporicida. Tuttavia il protocollo di disinfezione e lavaggio ha previsto 3 cicli che potrebbero aver eliminato anche batteri sporigeni. Nel caso in cui le spore fossero presenti solo sulla superficie esterna, l'acaro fungerebbe da vettore meccanico, mentre se fossero contenute all'interno del parassita, sarebbe interessante indagare il distretto anatomico di localizzazione. Se infatti questo fosse nell'apparato buccale, non si potrebbe escludere una contaminazione del sito d'attacco del parassita sulla cute dell'ospite e forme di patogenesi di botulismo ascrivibili a "botulismo da ferita".

CONCLUSIONI

Questo lavoro è la prima segnalazione della presenza di *Clostridium botulinum* in esemplari di acaro rosso.

Studi ulteriori sono necessari per dimostrare la capacità vettoriale di *Dermanyssus gallinae* per *Clostridium botulinum*; tuttavia, questa evidenza suggerisce un possibile meccanismo di trasmissione del botulismo tra differenti gruppi di galline ovaiole sia tra due cicli produttivi consecutivi. Per tale ragione trattamenti antiparassitari contro *D. gallinae*, dovrebbero essere presi in considerazione per prevenire la comparsa di episodi ricorrenti di botulismo nello stesso ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Anniballi F, Auricchio B, Woudstra C, Fach P, Fiore A, Skarin H, Bano L, Seegerman B, Knutsson R and D De Medici. (2013). Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecur. Bioterror. Suppl.* 1: S207-214.
2. Anniballi F, Fillo S, Giordani F, Auricchio B, Tehran DA, di Stefano E, Mandarino G, De Medici D and F Lista. (2016). Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis as a tool for molecular epidemiology of botulism: The Italian experience. *Infect. Genet. Evol.* 46: 28-32.
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. Binetruy F, Dupraz M, Buysse M et al. (2019). Surface sterilization methods impact measures of internal microbial diversity in ticks. *Parasit. Vectors* 12: 268.
5. Boulianne M and FA Uzal. (2013). Botulism. In: Swine E. D. (Eds.), *Diseases of Poultry 14th ed.*, Wiley Blackwell Press, Hoboken, NJ, pp. 976-980.
6. CRNB. (2023). 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>
7. Cociolo G, Circella E, Pugliese N, Lupini C, Mescolini G, Catelli E, Borcherchert-Stuhlträger M, Zoller H, Thomas E and A Camarda. (2020). Evidence of vector borne transmission of *Salmonella enterica enterica* serovar Gallinarum and fowl typhoid disease mediated by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Parasit. Vectors* 13: 513.
8. Cordioli B, Rizzardi A, Guolo A, Ferro T, Bacchin C, Garbuio M, Anniballi F, De Santis P, Koene M, Le Maréchal C, Skarin H, Seyboldt C and L Bano.

- (2024). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium botulinum* group III field strains isolated in Europe from animal outbreaks. *Vet. Microbiol.* 298: 110281.
9. Cordioli B, Zandonà L, Harper V, Garbuio M, Drigo I, Guolo A, Genovese S, Ferro T, Capello K, Viel L and L Bano. (2024). Implicazioni di sicurezza alimentare in episodi di botulismo in galline ovaiole. Atti del IX Simposio Scientifico SIPA, 12-13 settembre 2024, Lodi, Italia.
 10. Russell AD. (1990). Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(2): 99-119.
 11. Souillard R, Grosjean D, Le Gradiet T, Poezevara T, Rouxel S, Balaine L, Macè S, Martin L, Annibaldi F, Chemaly M, Le Bouquin S and C Le Marechal. (2021). Asymptomatic carriage of *C. botulinum* type D/C in broiler flocks as the source of contamination of a massive botulism outbreak on a dairy cattle farm. *Front. Microbiol.* 12: 679377.
 12. Tomley FM and O Sparagano. (2018). Spotlight on avian pathology: red mite, a serious emergent problem in layer hens. *Avian Pathol.* 47: 533-535.
 13. Van Belkum A. (2007). Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 22-27.
 14. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OA and L Zenner. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol.* 48: 93-104.
 15. Zandonà L, Drigo I, Cordioli B, Genovese S, Moschioni C, Guolo A, Rizzardi A, Tonon E, Viel L and L Bano. (2024). 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.

VALUTAZIONE IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI UN VACCINO INATTIVATO PER LA PREVENZIONE DEL BOTULISMO IN GRUPPI COMMERCIALI DI OVAIOLE

Zandonà L.¹, Tonon E.¹, Genovese S.¹, Garbuio M.¹, Harper V.², Drigo I.¹, Viel L.¹, Bano L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT2 sezione di Treviso, Vicolo Giuseppe Mazzini 4, 31020, Fontane di Villorba (TV), Italia;*

²*Medico veterinario libero professionista settore avicolo, Italia.*

Summary

Avian botulism is a significant threat to poultry, causing high mortality rates and substantial economic losses. While various preventive measures exist, vaccination has proven particularly effective in managing recurrent outbreaks.

In a recent study, we investigated the immune response in a subgroup of 7,500 laying hens from a total flock of 32,000. These birds were vaccinated with a tailor-made toxoid vaccine prior to their laying period. This specialized vaccine was developed to specifically target the mosaic variant of botulinum neurotoxin type C/D. The flock was vaccinated twice at 13 and 16 weeks of age.

To evaluate the immune response, we developed an in-house indirect ELISA using botulinum neurotoxin (BoNT) serotype C/D as the capture antigen. Blood samples were collected before vaccination at 13 weeks (T0) and after the booster at 17 (T1), 22 (T2), 50 (T3) and 65 weeks of age (T4). Our findings revealed a sharp increase in antibody titers immediately following the first vaccination (T1). While a slight decrease was observed at T2, high antibody levels persisted at 50 and 65 weeks of age. This data strongly indicates a persistent antibody titer throughout the birds' production cycle.

Vaccinated birds showed no clinical signs of botulism, whereas a few cases were observed in the unvaccinated flock. Furthermore, the overall cumulative mortality at 61 weeks of age was lower than in previous flocks affected by botulism housed in the same shed. Our findings strongly suggest that combining vaccination with improved, targeted management practices can effectively prevent recurrent outbreaks of avian botulism in laying hens. This dual approach offers a robust strategy for protecting poultry flocks from this significant disease.

INTRODUZIONE

Il botulismo è una grave malattia causata dall'azione della neurotossina botulinica (BoNT) prodotta da batteri appartenenti al genere *Clostridium*. Tale tossina agisce a livello di membrana presinaptica neuronale attraverso un meccanismo che in sintesi porta al blocco del rilascio dell'acetilcolina che è alla base della sintomatologia paralitica che si osserva nei soggetti colpiti. In natura, gli uccelli selvatici risultano spesso colpiti dal botulismo con mortalità anche elevata mentre nel pollame allevato storicamente sono i gruppi di fagiani ad essere più colpiti in virtù delle condizioni semi-brade in cui vengono allevati. Esistono 7 sierotipi di BoNT (A-G) e il sierotipo più frequentemente riscontrato è il mosaico C/D sebbene siano stati segnalati episodi sostenuti da BoNT tipo A, tipo E e tipo D (Bouliane e Uzal, 2013; Skarin et al., 2015;

Zandonà et al., 2023). La vaccinazione rappresenta una valida opzione profilattica ma non essendo disponibili presidi immunizzanti commerciali, è necessario ricorrere a vaccini stabulogeni. Questo lavoro vuole valutare la risposta umorale e l'efficacia clinica della vaccinazione di galline ovaiole commerciali con vaccino stabulogeno costituito da tossoide di tipo C/D.

MATERIALI E METODI

Animali e campionamento

Il vaccino stabulogeno antibiotulinico è stato valutato in un gruppo di ovaiole accasato in un allevamento che aveva sperimentato episodi ricorrenti di malattia (Cor-dioli et al., 2024). 7500 soggetti appartenenti a un gruppo di 32.600 ovaiole sono stati vaccinati in fase di pollastra per via sottocutanea con stabulogeno somministrato 2 volte a distanza di 3 settimane e accasati in deposizione in voliere poste in un lato noto del capannone. Campioni di sangue sono stati prelevati a 13 (T0) e 17 (T1) settimane, rispettivamente prima di essere vaccinati e dopo il primo intervento e successivamente a 20 (T2), 50 (T3) e 65 (T4) settimane. Il prelievo a T4 è stato effettuato anche da animali non vaccinati conviventi. I prelievi ematici sono stati effettuati contestualmente a monitoraggi sierologici aziendali con finalità diagnostiche. Durante l'ispezione sanitaria giornaliera degli animali è stata valutata l'insorgenza di sintomi compatibili con botulismo (abbattimento, ventrofflessione del collo, paralisi flaccida) ed è stata registrata la mortalità giornaliera. Nel gruppo valutato sono stati eseguiti 2 trattamenti antiparassitari con fluralaner (a 25 e 64 settimane), un trattamento con colistina a 62 settimane e 2 trattamenti con tilosina a 33 e 49 settimane.

Vaccino stabulogeno e valutazione della risposta anticorpale

Il ceppo batterico di *Clostridium botulinum* impiegato per la produzione dell'antigene è stato isolato dai precedenti episodi di botulismo nella stessa azienda ed è stato coltivato su un apposito apparato da dialisi in modo tale da massimizzare la resa di sintesi di tossina botulinica e ridurre la presenza di componenti del terreno di coltura. La tossina è stata purificata mediante centrifugazione, titolata e inattivata con formalina tamponata. Il vaccino è stato poi finalizzato mediante adiuvazione in alluminio potassio solfato dodecaidrato e i consueti controlli di sterilità ed innocuità.

L'andamento della risposta umorale alla vaccinazione è stata valutata mediante saggio ELISA indiretto utilizzando come capture l'antigene mosaico C/D impiegato per l'allestimento del vaccino stabulogeno prima dell'inattivazione (Bano et al., 2015).

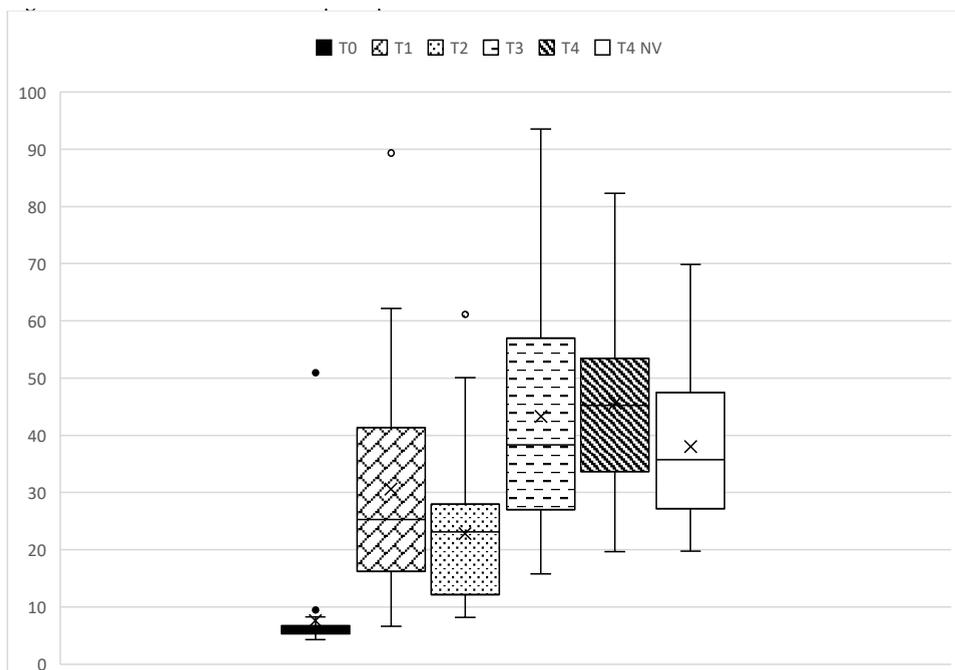
RISULTATI E DISCUSSIONE

In Tabella 1 sono rappresentati i dati relativi alla mortalità del gruppo vaccinato, non vaccinato e i dati di mortalità del ciclo precedente in cui si erano manifestati episodi di botulismo. Come si può notare le percentuali di mortalità riscontrate nel gruppo vaccinato e non vaccinato non si sono discostate tra loro mentre erano entrambi inferiori (7.8%-7.95%) rispetto alla mortalità osservata nel ciclo precedente alla stessa età (9.89%). Nel gruppo vaccinato la mortalità era riconducibile prevalentemente ad episodi di colibacillosi, cannibalismo e, nel gruppo non vaccinato, anche a sporadici casi di botulismo osservati nel mese di febbraio. In Figura 1 sono rappresentati graficamente i titoli anticorpali espressi in S/P ELISA.

Tabella 1. Dati di mortalità espressi in numero di morti mensili e percentuale relativa nel ciclo produttivo in corso e quello precedente.

		Gruppo non vaccinate 2024-2025 (25100 capi accasati)		Gruppo vaccinate 2024 - 2025 (7500 capi accasati)		Ciclo precedente (2022 - 2024) (98000 capi accasati)			
Mese	Età (sett.)	nr.	%	nr.	%	Mese	Età (sett.)	nr.	%
Giu- Lug	16-22	64	0.26	26	0.35	Dic	16-20	168	0.17
Ago	22-26	227	0.90	36	0.48	Gen	21-24	202	0.20
Sett	27-30	142	0.57	28	0.37	Feb	25-28	310	0.31
Ott	31-35	118	0.47	37	0.49	Mar	29-33	608	0.61
Nov	35-39	113	0.45	44	0.59	Apr	34-37	988	1.00
Dic	40-43	145	0.58	44	0.59	Mag	38-41	886	0.90
Gen	44-48	196	0.78	100	1.33	Giu	42-46	663	0.67
Feb	49-52	260	1.04	114	1.52	Lug	47-50	1712	1.73
Mar	53-56	421	1.68	80	1.07	Ago	51-55	2073	2.10
Apr	57-61	272	1.08	87	1.16	Sett	55-59	2172	2.20
Mag	61-63	/	/	/	/	Ott	60-63	1961	1.98
/	/	/	/	/	/	Nov	64-68	1395	1.41
/	/	/	/	/	/	Dic	68-72	1046	1.06
/	/	/	/	/	/	Gen	73-77	1359	1.37
/	/	/	/	/	/	Feb	77-81	770	0.78
/	/	/	/	/	/	Mar	81-85	375	0.38
/	/	/	/	/	/	Apr	86-88	148	0.15
TOTALE		1958	7.8	596	7.95	TOTALE		16836	17.3

Figura 1. Andamento dei titoli anticorpali espressi in S/P.



X: mediana; NV: non vaccinato. Il primo e terzo quartile sono rappresentati dai quadrati, i valori minimo e massimo dalle linee e i valori *outlayer* dai punti.

La metodica ELISA dimostra un innalzamento della risposta anticorpale nei confronti della tossina CD a T1, T2, T3 e T4 rispetto al titolo evidenziato prima della vaccinazione. Anche il titolo evidenziato nei soggetti non vaccinati al T4 è risultato maggiore rispetto a quello di T0, sebbene inferiore a quello di soggetti vaccinati della stessa età. Questo dato potrebbe essere dovuto all'entrata in contatto dei soggetti non-vaccinati con dosi sub-letali di tossina botulinica durante il ciclo oppure a reazioni sierologiche aspecifiche. I valori di mediana, primo quartile, terzo quartile, valore massimo e valore minimo osservati a T3 e T4 sono nettamente più elevati rispetto T0 e T1 dimostrando nel complesso un aumento dei titoli anticorpali osservati dopo due somministrazioni di vaccino che si mantiene elevato fino a 65 settimane (figura 1). Il grafico mostra un lieve decremento dei valori di terzo quartile e valore massimo di T2 rispetto T1 che denota un lieve calo dei titoli anticorpali dopo 2 somministrazioni. Questa modesta risposta al booster, potrebbe essere imputata allo stress indotto da molteplici vaccinazioni concomitanti e dall'accasamento in un nuovo ambiente e l'inizio della fase di deposizione.

La metodica ELISA rileva tutti gli anticorpi che reagiscono nei confronti degli epitopi presenti sulla tossina botulinica e non distinguono tra anticorpi protettivi (neutralizzanti) e anticorpi non protettivi, ma fornisce indicazioni sull'avvenuta sieroconversione dopo vaccinazione. Non è stato valutato il titolo neutralizzante in quanto questo prevede l'esecuzione di prove in vivo e pertanto necessita di specifica autorizzazione prevista per la sperimentazione animale.

Sebbene i risultati sierologici dimostrino la capacità del vaccino stabulogeno nell'evo-care una risposta anticorpale rispetto allo stato iniziale, non è stata osservata una differenza della mortalità tra il gruppo vaccinato e quello non vaccinato. Tale osser-vazione deve essere attribuita all'implementazione di alcuni accorgimenti gestionali tra cui l'accasamento razionale dei gruppi (gestione dei capannoni in macro-gruppi), allungamento del vuoto biologico ed implementazione dei protocolli di pulizia e dis-infezione con sostanze sporicide (clorocresolo e acido peracetico), miglioramento del controllo degli acari e delle mosche (trattamenti larvicidi, trappole a cattura, trattamenti abbattenti), in aggiunta alla vaccinazione. Durante la fase produttiva è stata implementata l'ispezione giornaliera degli animali con rimozione tempestiva dei soggetti morti, l'osservazione di eventuali sintomi ascrivibili a botulismo e, nel caso di episodi di botulismo, rimozione della lettiera e disinfezione. La presenza di carcasse che rimangono in allevamento è considerato infatti uno dei fattori di rischio più importanti per il mantenimento del botulismo aviare (Sato et al., 2016). Nei gruppi vaccinati non è stata clinicamente osservata nessuna sintomatologia ascrivi-bile a botulismo. Alla sessantunesima settimana la mortalità del gruppo attualmente presente era inferiore del 2% rispetto a quella del ciclo precedente alla stessa età, ma una valutazione andrà effettuata a fine ciclo comparando le mortalità cumulative che, nel ciclo precedente avevano superato il 17%.

CONCLUSIONI

L'approccio integrato di vaccinazione e implementazione del management, come sopra descritto, si sono dimostrati efficaci nell'impedire la ricomparsa della malattia in gruppi di ovaiole consecutivi allevati nello stesso ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Bano L, Drigo I, Tonon E, Berto G, Tavella A, Woudstra C, Capello K and F Ag-noletti. (2015). Evidence for a natural humoral response in dairy cattle affected by persistent botulism sustained by non-chimeric type C strains. *Anaerobe*. 36: 25-9.
2. Boulianne M and FA Uzal. (2013). Botulism. In: Swine ED (Eds.), *Diseases of Poultry 14th ed.*, Wiley Blackwell Press, Hoboken, NJ, pp. 976-980.
3. Cordioli B, Zandonà L, Harper V, Garbuio M, Drigo I, Guolo A, Genovese S, Ferro T, Capello K, Viel L, and L Bano. (2024). Implicazioni Di Sicurezza Alimen-tare In Episodi Di Botulismo In Galline Ovaiole. *Atti del IX Simposio Scien-tifico SIPA*, 12-13 Settembre 2024, Lodi (LO), Italia.
4. Sato Y, Wigle WL, Gallagher S, Johnson AL, Sweeney RW and PS Wakenell. (2016). Outbreak of Type C Botulism in Commercial Layer Chickens. *Avian Dis.* 60(1): 90-4.
5. Skarin H, Lindgren Y and DS Jansson. (2015). Investigations into an Outbreak of Botulism Caused by *Clostridium botulinum* Type C/D in Laying Hens. *Avian Dis.* 59(2): 335-40.
6. Zandonà L, Drigo I, Cordioli B, Genovese S, Moschioni C, Guolo A, Rizzardi A, Tonon E, Viel L and L Bano. (2023). Animal Botulism: a 14-Years Experi-ence of a Veterinary Diagnostic Laboratory. *Proceedings of the 59th Interagen-cy Botulism Research Coordinating Committee Annual Meeting*. 23-25 ottobre 2023, Madison, WI, USA.



**PREMIO CORRADO LONGONI
VINCITORE**

VALIDAZIONE DI UN SAGGIO DI RT-PCR SPECIFICO PER IL GENOTIPO GVIII DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA E PRIMA IDENTIFICAZIONE DI CEPPI IB80-LIKE (LINEAGE GVIII-2) IN ITALIA

Legnardi M.¹, Poletto F.¹, Franzo G.¹, Harper V.², Bianco L.², Andolfatto C.¹, Blanco A.³, Biarnés M.³, Ramon L.³, Cecchinato M.¹, Tucciarone C.M.¹

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

²*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 diagnostic activities. In April-June 2024, pools of tracheal or cloacal swabs were collected from 84 flocks raised in 24 layer farms located across six regions. IB80-like strains were found in 11 flocks (13.1%) from 5 farms (20.8%), highlighting a considerable circulation. Based on partial S1 sequencing, the strains shared a 97.1-99.7% genetic identity and were 96.8-97.7% identical to the IB80 prototype strain. The presented results are critical to raise the awareness about the presence of GVIII-2 strains in Italy, prompting the need to update diagnostic approaches to allow their detection and better understand the epidemiology of this emerging lineage.

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 eziolo-

logico, noto come virus della bronchite infettiva (IBV), obbliga ad un ricorso presoché 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 [1].

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 [2].

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.) [3-7].

Tra le novità epidemiologiche più rilevanti degli ultimi anni si annovera la descrizione del ceppo IB80, principale esponente del *lineage* GVIII-2 [7]. 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 [7-10]. Petzoldt et al. [7] 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 tuttavia prodotto alcuna sintomatologia [11], 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 comunemente 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

Diverse coppie di *primer* sono state disegnate utilizzando il software *Geneious Prime* (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) sulla base delle sequenze del gene S1 di ceppi GVIII disponibili in GenBank al momento dello studio. La coppia più performante è stata poi individuata testando un pannello di diluizioni seriali di un plasmide contenente la sequenza del gene S1 del ceppo prototipo di GVIII-2, CK/DE/IB80/2016 (*Genbank accession n.* MT591566), variando la temperatu-

ra della fase di *annealing* e la durata della fase di allungamento sulla base delle temperature di *melting* dei *primer* e la lunghezza dell'amplicone desiderato. Le restanti specifiche sono state invece stabilite seguendo le indicazioni della ditta produttrice del kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), utilizzato in tutte le fasi dello studio.

All'individuazione dei *primer* e del protocollo termico è seguita la validazione analitica del saggio molecolare. La sensibilità analitica è stata determinata testando per 5 volte delle diluizioni seriali in base 10 del plasmide (10^8 - 10^0 copie/ μ L). La specificità è stata valutata analizzando campioni positivi a *lineage* non-GVIII comunemente diagnosticati nel contesto italiano, tra cui GI-1 (Mass), GI-12 (D274), GI-13 (793B), GI-16 (Q1), GI-19 (QX), GI-23 (Variante 2) e GII-1 (D1466), oltre che ad altri patogeni respiratori ritrovabili in coinfezione con IBV come il virus della malattia di Newcastle (NDV), il metapneumovirus aviario (aMPV) e il virus della laringotracheite infettiva (ILTV). Infine, la ripetibilità e l'applicabilità in contesti diagnostici reali sono state valutate attraverso lo svolgimento in triplicato, in diversi momenti e da parte di diversi operatori, delle analisi di un pannello di 14 campioni, che includeva, oltre a 8 campioni d'archivio selezionati casualmente, altri 6 di origine spagnola e per cui la positività a GVIII era già stata accertata dal Centro di Sanità Avicola di Catalogna e Aragona (CESAC, Reus, Tarragona). Per confermare la diagnosi, tutti i 14 campioni erano stati precedentemente testati con il kit commerciale *Kylo R® IBV-Variant IB80* (AniCon Labor GmbH, Hoeltinghausen, Germany), con cui era stata accertata la positività dei campioni di origine spagnola e la negatività dei rimanenti.

Successivamente alla validazione, il saggio di RT-PCR 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), come parte di un pannello di metodiche per la ricerca di IBV selezionate sulla base del contesto epidemiologico e delle vaccinazioni adottate. Alla luce del potenziale tropismo e del maggior impatto dimostrato dai ceppi *IB80-like* per le tipologie produttive a lunga vita [7], la metodica GVIII-specifica è stata utilizzata per analizzare i campioni ricevuti da allevamenti di ovaiole e riproduttori, che consistevano in pool di tamponi tracheali o cloacali.

Nel caso di risultati positivi, la porzione del genoma amplificata 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 eseguiti 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 [12]. Oltre alla metodica GVIII-specifica sono state condotte ulteriori analisi con una metodica di RT-PCR generica basata sui *primer* XCE1+/XCE2- [13], permettendo l'individuazione di eventuali coinfezioni.

RISULTATI

La fase di messa a punto del saggio di RT-PCR ha visto la selezione della copia di *primer* IB80-672F (5'-CTAAGGGGGTTTTGGCTTGC-3') e IB80-1349R (5'-GTAACCACCGGATAAGGCCA-3'), che consentivano l'amplificazione di

una porzione di 676 nucleotidi del gene S1. Il protocollo termico individuato era così composto:

- Retrotrascrizione: 50°C per 30 min;
- Pre-denaturazione: 95°C per 2 min;
- 45 cicli di:
 - Denaturazione: 95°C per 15 s;
 - *Annealing*: 56°C per 20 s;
 - Allungamento: 68°C per 1 min;
- Allungamento finale: 68°C per 5 min.

Tale saggio ha dimostrato buone prestazioni in fase di validazione. Per quanto riguarda la sensibilità analitica, la diluizione meno concentrata tra quelle positive è risultata essere quella contenente 10¹ copie/μL in 3 replicati, e 10⁰ copie/μL nei rimanenti 2 casi. La *limit of detection* (LoD50) è stato quindi fissata a 10¹ copie/μL. La specificità è risultata essere perfetta, in quanto nessuno dei ceppi non-GVIII e dei diversi patogeni respiratori è risultato positivo. La ripetibilità è stata parimenti ottimale, essendo i 6 campioni spagnoli risultati sempre positivi e i restanti 8 sempre negativi.

La metodica GVIII-specifica è stata quindi implementata nella pratica diagnostica, evidenziando la positività di 11 campioni sugli 84 totali (13.1%), prelevati da gruppi appartenenti a 5 allevamenti sui 24 (20.8%) indagati tra aprile e giugno 2024 (Figura 1).

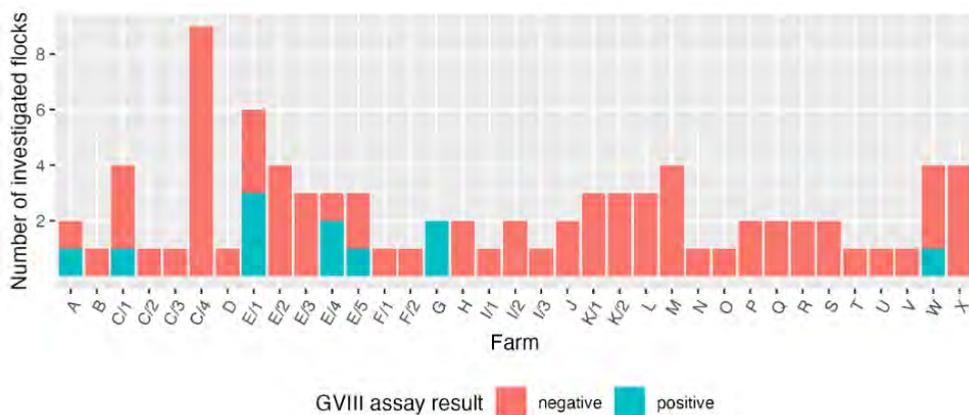


Figura 1. Risultati delle analisi eseguite utilizzando il saggio GVIII-specifico. Ad ogni allevamento è stata assegnata una lettera identificativa, a cui segue un numero progressivo nel caso di campionamenti multipli in momenti diversi.

Gli allevamenti di ovaiole positivi erano localizzati in Veneto, Lombardia, Friuli Venezia-Giulia ed Emilia-Romagna, mentre nessuna positività è stata rilevata in Lazio e Piemonte. Utilizzando la metodica di RT-PCR generica sono state invece accertate 18 positività (21.4%) in 12 allevamenti (50%) a ceppi 793/B di origine vaccinale, e 7 positività (8.3%) in 3 allevamenti (12.5%) a ceppi QX di presumibile origine di campo. Sono state rilevate 5 coinfezioni, 2 tra ceppi GVIII e 793/B e 3 tra stipiti GVIII e QX (Tabella 1).

Tabella 1. Dati relativi ai campioni risultati positivi alla ricerca di ceppi GVIII. Le sequenze di ceppi contrassegnati da un asterisco (*) non sono state sottomesse in GenBank in quanto identiche ad altri stipiti identificati nello stesso allevamento.

Campione	Allevamento	Matrice	Provincia	Età (sett.)	Anamnesi	Risultato RT-PCR generica	GenBank accession n.
J205	B	Tamponi cloacali	Mantova	37	Sintomi respiratori	Negativo	PQ067232
J252	C	Tamponi tracheali	Verona	21	/	Negativo	PQ067233
J333	E	Tamponi tracheali	Bologna	50	/	Negativo	PQ067234
J335	E	Tamponi tracheali	Bologna	29	/	GI-13 (793B)	N.D.*
J336	E	Tamponi tracheali	Bologna	49	/	GI-19 (QX)	PQ067235
J985	E	Tamponi tracheali	Bologna	18	/	GI-19 (QX)	PQ067236
J986	E	Tamponi tracheali	Bologna	18	/	Negativo	N.D.*
K059	E	Tamponi tracheali	Bologna	50	/	Negativo	PQ067237
J465	G	Tamponi tracheali	Mantova	29	Calo ovodeposizione, gusci pallidi	Negativo	PQ067238
J466	G	Tamponi tracheali	Mantova	29	Calo ovodeposizione, gusci pallidi	GI-13 (793B)	N.D.*
J863	W	Tamponi tracheali	Pordenone	30	/	GI-19 (QX)	PQ067239

Le positività alla metodica GVIII-specifica sono risultate ascrivibili a ceppi contraddistinti da un'identità generica compresa tra il 96.8% e il 99.7%. L'esecuzione di una ricerca BLAST [14] ha evidenziato l'esistenza in GenBank di 20 sole sequenze con una percentuale di identità superiore all'80%, di cui solo 14 con un *coverage* completo della porzione del gene S1 amplificata. I risultati delle analisi filogenetiche (Figura 2) hanno permesso di determinare l'appartenenza delle sequenze italiane al *lineage* GVIII-2, e in particolare ad una *clade* che comprendeva anche un ceppo identificato in Giordania nel 2021. L'identità genetica con il ceppo IB80, appartenente ad una *clade* contenente solo sequenze tedesche, era invece compresa tra il 96.8 e il 97.7%.

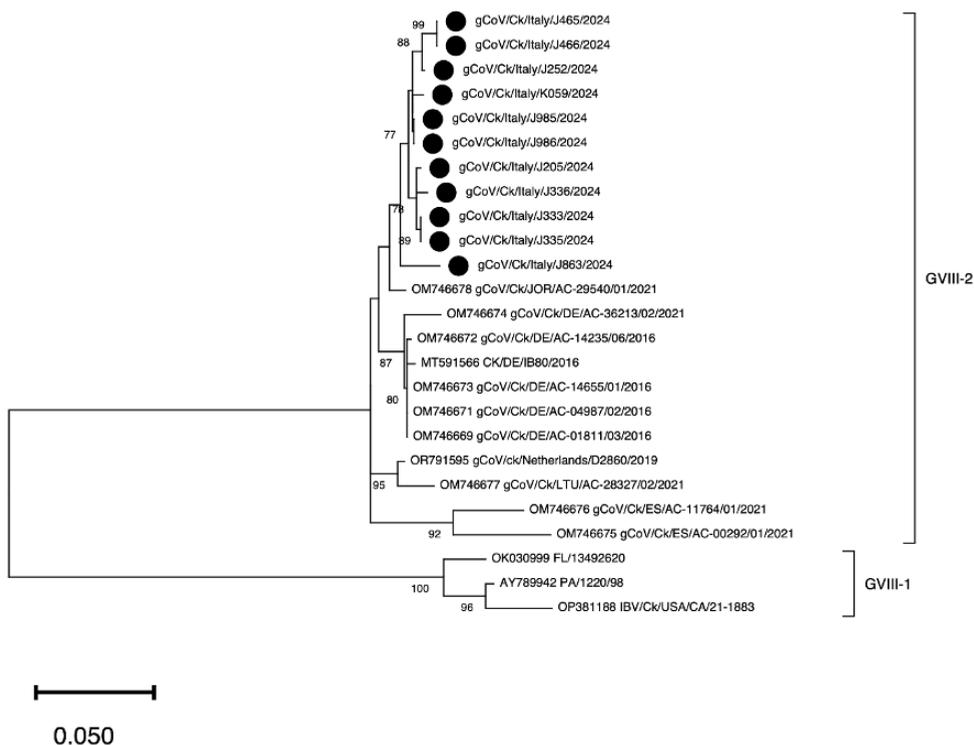


Figura 2. Albero filogenetico illustrante le relazioni filogenetiche tra i ceppi IB80-like sequenziati nel presente studio (contrassegnati dal simbolo ●) e le sequenze appartenenti al genotipo GVIII reperibili in GenBank. L'albero è stato costruito con il modello di sostituzione GTR+G [15], selezionato sulla base del valore di *Bayesian information criterion (BIC)*, e 1000 repliche *bootstrap*. I valori di supporto nodale sono mostrati solo se uguali o superiori a 70.

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. La circolazione di tale *lineage* è apparsa significativa, interessando circa il 20% degli allevamenti campionati. In alcuni di essi, le positività sono inoltre state rilevate in gruppi e momenti di campionamento differenti, dimostrando la possibilità di una protratta circolazione interna.

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 limiti le conclusioni epidemiologiche che si possono trarre dalla filogenesi.

Confermando quanto già segnalato nella letteratura attualmente disponibile [7], 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. Ulteriori interrogativi riguardano la rilevanza clinica di tali infezioni, in quanto l'anamnesi relativa ai gruppi positivi è risultata spesso incospicua e comunque non univoca, con un solo gruppo interessato da problemi respiratori e altri due (appartenenti però allo stesso allevamento) da cali dell'ovodeposizione. Conseguentemente, non è stato possibile confermare l'effettivo impatto dei ceppi identificati, la cui definizione richiederà studi dedicati.

CONCLUSIONI

La prima identificazione, qui riportata, di ceppi GVIII-2 in Italia risulta di grande importanza 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*. A fronte delle limitate soluzioni diagnostiche ad oggi disponibili, la validazione di una metodica di RT-PCR di facile applicabilità va quindi considerata un risultato egualmente rilevante rispetto alla produzione di dati epidemiologici, offrendo un'utile risorsa per la ricerca dell'intero genotipo GVIII e quindi potenzialmente utilizzabile anche in contesti epidemiologici differenti da quello italiano.

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, a partire dal suo effettivo impatto clinico ed economico e dalla possibile circolazione in categorie produttive diverse dalle ovaiole.

BIBLIOGRAFIA

1. Jordan B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Veterinary Microbiology*, 206: 137–143.
2. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G and M Cecchinato. (2020). Infectious bronchitis virus evolution, diagnosis and control. *Veterinary Sciences*, 7: 79.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Romero Tejada A, De Herdt P, Koopman R, Fortin A, Drago A, Cecchetti 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton, and C. J. Naylor. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28: 593–605. 1999.
 14. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and DJ Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
 15. Nei M and S Kumar. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY, USA.

CANDIDATI PREMIO

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

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

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

² *Unità Operativa Complessa Igiene Veterinaria, A.U.S.L. di Imola, viale Giovanni Amendola 2, 40026 Imola (BO)*

³ *Servizi Veterinari del Gruppo Eurovo, via Ugo la Malfa 15, 40026 Imola (BO), Italia;*

⁴ *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. Among these, 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 in 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 from 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 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 specific species that could be prioritized for epidemiological surveys of poultry pathogens and underline the importance of diligent application and implementation of biosecurity measures. The data lay the groundwork for designing novel surveillance and intervention strategies to prevent cross-species disease transmission and 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 di malattie 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 di origine virale o batterica (Ayala, Yabsley, & Hernandez, 2020; Graziosi, Catelli, Fanelli, & Lupini, 2022; Graziosi, Lupini, & Catelli, 2022; Tucciarone, Franzo, Legnardi, Pasotto, Lupini, Catelli, Quaglia, Graziosi, Dal Molin, Gobbo, & Cecchinato, 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 parti-

re 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, Lewis, Pohlmann, Baillie, Banyard, Beer, Brown, Fouchier, Hansen, Lameris, Lang, Laurendeau, Lung, Robertson, van der Jeugd, Alkie, Thorup, van Toor, Waldenström, Yason, Kuiken, & Berhane, 2022; European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoch, Fusaro, Gonzales, Kuiken, Marangon, Mirinaviciute, Niqueux, Stahl, Staubach, Terregino, Broglia, & Baldinelli, 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, Opolska, Lisowska, & Szczotka-Bochniarz, 2023; Snipes, Carpenter, Corn, Kasten, Hirsh, Hird, & McCapes, 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 commerciali 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, si è concentrato sull'identificazione delle specie di uccelli e mammiferi selvatici osservate nei dintorni dei capannoni, sulla descrizione dei loro comportamenti e sulla caratterizzazione spazio-temporale delle visite.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Lo studio è stato condotto in tre allevamenti commerciali di galline ovaiole della provincia di Bologna, identificati come Allevamento 1, Allevamento 2 ed Allevamento 3. Questi sono stati randomicamente selezionati da un gruppo di 20 allevamenti sotto la competenza della Unità Operativa Complessa di Igiene Veterinaria dell'A.U.S.L. di Imola, che avevano segnalato la presenza di fauna selvatica nelle vicinanze dei capannoni avicoli. In seguito alla selezione degli allevamenti, la preliminare autorizzazione allo svolgimento dello studio è stata ottenuta presso l'Azienda proprietaria. I tre allevamenti arruolati erano localizzati all'interno di una "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/renderNormsan-Pdf?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 un sistema di allevamento *indoor* degli animali, in voliera. L'Allevamento 2 risultava invece di tipo biologico, con accesso all'esterno consentito alle galline ovaiole in base alla situazione epidemiologica per l'IA. Sei video-trappole (Dark-Ops Pro XD Dual Lens, Browning Trail Cameras, UT), due per allevamento, sono state collocate rispettivamente nella zona di raccolta della pollina e vicino ai silos del mangime. Inoltre, una video-trappola è stata installata all'interno di uno dei parchetti esterni ad accesso degli animali 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 ore su 24 per un anno, da gennaio e dicembre 2021, ed hanno acquisito filmati di 30 secondi ciascuno.

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 di animale selvatico osservata è stato calcolato il numero di visite medie nel corso dell'anno e la percentuale di com-

portamenti mostrati. 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, 27 specie sono state identificate, appartenenti a 16 diverse famiglie tassonomiche: Anatidae, Ardeidae, Columbidae, Corvidae, Falconidae, Fringillidae, Motacillidae, Muscicapidae, Passeridae, Phasianidae, Rallidae, Strigidae, Sturnidae, Threskiornithidae, Turdidae, e Upupidae. La maggior parte dei filmati ha mostrato individui di gazza euroasiatica (*Pica pica*), tortore dal collare orientale (*Streptopelia decaocto*) e 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 quello di ricerca ed assunzione di cibo. Per quanto riguarda la presenza di mammiferi entro i confini dell'allevamento, sette specie sono state osservate, quali nutria (*Myocastor coypus*), riccio (*Erinaceus europaeus*), ratti o topi (*Rattus* spp., *Apodemus* spp., *Mus* spp.), lepre (*Lepus europaeus*), volpe (*Vulpes vulpes*) e faina (*Martes foina*). A differenza dei volatili selvatici, la maggior parte delle osservazioni di mammiferi ha riguardato animali in movimento attraverso 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, mentre per i mammiferi, un picco di visite durante i mesi invernali. I risultati dei modelli generalizzati hanno indicato la localizzazione della video-trappola in allevamento e la stagione monitorata come variabili influenti per il numero di visite giornaliere di fauna selvatica in allevamento.

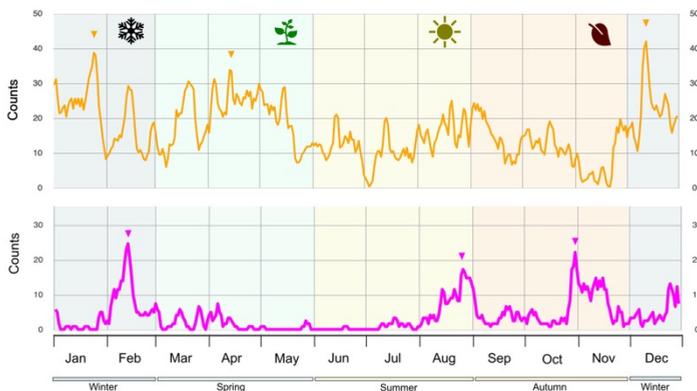


Figura 1. Media mobile su tre mesi delle visite giornaliere di uccelli (grafico a linee superiore, in arancione) e mammiferi (grafico a linee inferiore, in rosa) nei tre allevamenti di galline ovaiole studiati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio qui presentato ha avuto come obiettivo la caratterizzazione dell'interfaccia tra uccelli domestici allevati e 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, la diversità di specie di volatili e mammiferi selvatici e i loro comportamenti sono stati descritti, ed è stato quantificato il numero di visite giornaliere a seconda dei siti studiati. Per i volatili selvatici, le specie più frequentemente osservate sono state quelle degli uccelli sinantropi, quali gazze, tortore dal collare e fagiani. Trattasi di specie ad attitudine stanziale, suscettibili ad infezione da virus influenzali aviari e quindi potenzialmente coinvolte nella trasmissione del virus tra allevamenti infetti o tra altre specie di volatili selvatici infetti ed allevamenti (Shriner & Root, 2020). Tra queste, la gazza è inoltre inclusa nella lista di specie target per la sorveglianza passiva dell'IA negli uccelli selvatici (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Brown, Kuiken, Mulatti, Smietanka, Staubach, Stroud, Therkildsen, Willeberg, Baldinelli, Verdonck, & Adlhoch, 2017). Le abitudini alimentari di tali specie, con una dieta comprendente sia fonti proteiche che granaglie, le rendono particolarmente inclini alla ricerca di risorse alimentari presenti negli allevamenti avicoli quali mangime, residui organici nella pollina, e, nel caso di allevamenti di galline ovaiole, uova sfuggite al sistema di trasporto automatico dai capannoni al centro di lavorazione o imballaggio. Per quanto riguarda i volatili acquatici selvatici, tra questi sono state identificate due specie target per la sorveglianza IA: il germano reale (*A. platyrhynchos*) e l'airone cenerino (*A. cinerea*). In generale, queste specie sono state osservate esclusivamente nell'Allevamento 1, confinante con un lago di pesca sportiva, a conferma dello stretto legame esistente tra gli uccelli acquatici e gli specchi d'acqua (McDuie, Matchett, Prosser, Takekawa, Pitesky, Lorenz, McCuen, T, Ackerman, De La Cruz, & Casazza, 2022). Per quanto riguarda i mammiferi, la maggior parte delle osservazioni hanno riguardato nutrie (*M. coypus*), ricci (*E. europaeus*) ed i ratti. Dal punto di vista comportamentale, a differenza degli uccelli, i mammiferi selvatici hanno mostrato una scarsa frequenza di attività di foraggiamento presso le aree dei silos e di raccolta di pollina. La presenza di questi individui entro i confini dell'allevamento può infatti essere ricondotta al tipo di ambiente in cui l'allevamento stesso è localizzato. In particolare, la presenza delle nutrie si ritiene essere legata prevalentemente alla presenza di prati utili per il foraggiamento, canali di irrigazione perimetrali o zone rifugio rappresentate dai canali di scolo in allevamento stesso. Dal punto di vista della suscettibilità all'infezione da virus influenzali, se per la nutria non ci sono ancora evidenze, è stata dimostrata sierconversione in seguito ad infezione da virus influenzali di tipo A, in ratti che vivono in prossimità di specchi d'acqua frequentati da uccelli acquatici selvatici (Root & Shriner, 2020). Anche il trasporto meccanico del virus, ad esempio sul pelo, può rappresentare un fattore di rischio di introduzione di IA in allevamento (Velkers, Blokhuis, Veldhuis Kroeze, & Burt, 2017). In generale, roditori e nutrie sono *pest species* tenute sotto controllo, rispettivamente, mediante programmi di derattizzazione e prelievo venatorio. Visto il rilevamento di questi animali nelle vicinanze dei capannoni, è importante la corretta applicazione ed implementazione dei protocolli di derattizzazione e l'adeguato controllo numerico delle nutrie in vicinanza degli allevamenti stessi.

I risultati della caratterizzazione dell'interfaccia tra uccelli domestici allevati e fauna selvatica qui presentati pongono le basi per l'identificazione di nuove strategie di sorveglianza e di controllo per la riduzione del rischio di trasmissione tra animali domestici e selvatici, da adattare a ciascun contesto studiato. In generale, la pulizia e la manutenzione delle aree di allevamento risultano essere elementi essenziali per la riduzione la disponibilità di alimento e la generale attrattività delle aree di allevamento per gli animali selvatici. Questo, insieme

alla continua applicazione ed implementazione delle misure di biosicurezza, rappresenta un importante strumento di prevenzione della trasmissione di malattie tra animali domestici e selvatici. Futuri studi epidemiologici nelle specie più frequentemente osservate in allevamento potranno essere svolti al fine di meglio identificare quali animali possano essere più rischiosi per la trasmissione di agenti patogeni di interesse per il settore avicolo e per la sanità pubblica, e per la formulazione di più specifiche strategie di controllo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ayala, A. J., Yabsley, M. J., & Hernandez, S. M. (2020). A Review of Pathogen Transmission at the Backyard Chicken-Wild Bird Interface. *Front Vet Sci*, 7, 539925. doi:10.3389/fvets.2020.539925
2. Caliendo, V., Lewis, N. S., Pohlmann, A., Baillie, S. R., Banyard, A. C., Beer, M., Brown, I. H., Fouchier, R. A. M., Hansen, R. D. E., Lameris, T. K., Lang, A. S., Laurendeau, S., Lung, O., Robertson, G., van der Jeugd, H., Alkie, T. N., Thorup, K., van Toor, M. L., Waldenström, J., Yason, C., Kuiken, T., & Berhane, Y. (2022). Transatlantic spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wild birds from Europe to North America in 2021. *Scientific Reports*, 12(1), 11729. doi:10.1038/s41598-022-13447-z
3. Craft, M. E. (2015). Infectious disease transmission and contact networks in wildlife and livestock. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1669). doi:10.1098/rstb.2014.0107
4. Daszak, P. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. *Science*, 287.
5. Domanska-Blicharz, K., Opolska, J., Lisowska, A., & Szczotka-Bochniarz, A. (2023). Bacterial and Viral Rodent-borne Infections on Poultry Farms. An Attempt at a Systematic Review. *J Vet Res*, 67(1), 1-10. doi:10.2478/jvetres-2023-0012
6. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Brown, I., Kuiken, T., Mulatti, P., Smietanka, K., Staubach, C., Stroud, D., Therkildsen, O. R., Willeberg, P., Baldinelli, F., Verdonck, F., & Adlhoch, C. (2017). Avian influenza overview September - November 2017. *EFSA J*, 15(12), e05141. doi:10.2903/j.efsa.2017.5141
7. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J. L., Kuiken, T., Marangon, S., Mirinaviciute, G., Niqueux, E., Stahl, K., Staubach, C., Terregino, C., Broglia, A., & Baldinelli, F. (2023). Avian influenza overview December 2022 - March 2023. *EFSA J*, 21(3), e07917. doi:10.2903/j.efsa.2023.7917
8. Graziosi, G., Catelli, E., Fanelli, A., & Lupini, C. (2022). 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*, 69(5), 2800-2815. doi:10.1111/tbed.14433
9. Graziosi, G., Lupini, C., & Catelli, E. (2022). Disentangling the role of wild birds in avian metapneumovirus (aMPV) epidemiology: A systematic review and meta-analysis. *Transbound Emerg Dis*, 69(6), 3285-3299. doi:10.1111/tbed.14680
10. Greenberg, S., & Godin, T. (2012). Timelapse Image Analysis Manual. Technical Report 2012-1028-11. doi:<https://grouplab.cpsc.ucalgary.ca/grouplab/uploads/Publications/Publications/2012-TimelapseImageAnalysis.Report2012-1028-11.pdf>
11. McDuie, F., Matchett, E. L., Prosser, D. J., Takekawa, J. Y., Pitesky, M. E., Lorenz, A. A., McCuen, M. M., T, O. C., Ackerman, J. T., De La Cruz, S. E. W., & Casazza, M. L. (2022). Pathways for avian influenza virus spread: GPS reveals wild waterfowl in commercial livestock facilities and connectivity with the natural wetland landscape. *Transbound Emerg Dis*, 69(5), 2898-2912. doi:10.1111/tbed.14445

12. Root, J., & Shriner, S. (2020). Avian Influenza A Virus Associations in Wild, Terrestrial Mammals: A Review of Potential Synanthropic Vectors to Poultry Facilities. *Viruses*, *12*(12). doi:10.3390/v12121352
13. Shriner, S. A., & Root, J. J. (2020). A Review of Avian Influenza A Virus Associations in Synanthropic Birds. *Viruses*, *12*(11). doi:10.3390/v12111209
14. Snipes, K. P., Carpenter, T. E., Corn, J. L., Kasten, R. W., Hirsh, D. C., Hird, D. W., & McCapes, R. H. (1988). *Pasteurella multocida* in Wild Mammals and Birds in California: Prevalence and Virulence for Turkeys. *Avian Diseases*, *32*(1), 9-15. doi:10.2307/1590942
15. Tucciarone, C. M., Franzo, G., Legnardi, M., Pasotto, D., Lupini, C., Catelli, E., Quaglia, G., Graziosi, G., Dal Molin, E., Gobbo, F., & Cecchinato, M. (2022). Molecular Survey on A, B, C and New Avian Metapneumovirus (aMPV) Subtypes in Wild Birds of Northern-Central Italy. *Vet Sci*, *9*(7). doi:10.3390/vetsci9070373
16. Velkers, F. C., Blokhuis, S. J., Veldhuis Kroeze, E. J. B., & Burt, S. A. (2017). The role of rodents in avian influenza outbreaks in poultry farms: a review. *Vet Q*, *37*(1), 182-194. doi:10.1080/01652176.2017.1325537

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

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

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia (BO), 40064, Italia

²Dipartimento 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 μl di soluzione sterile di fosfato tamponato (PBS) 1X e da 25 mg da 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

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

Specie campionate	N° animali	AdVs PCR positivi		Classificazione			
		N°	% positività	Siadenovirus		Atadenovirus	Non classificato
				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%)

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

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

Specie campionate	N° animali	AdVs PCR positivi		Classificazione		
		N°	% positività	Siadenovirus	Atadenovirus	Non classificato
				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%)

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)

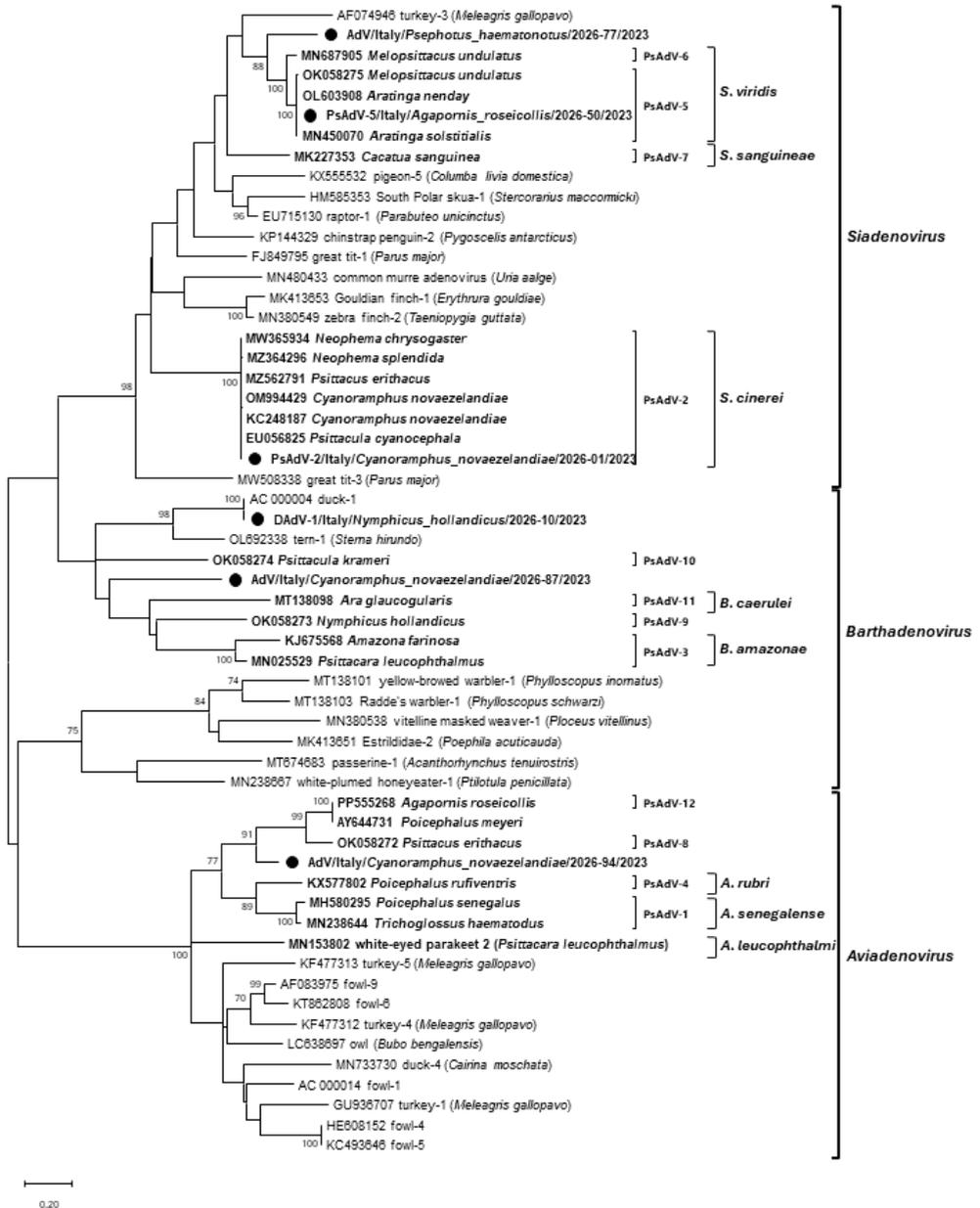


Fig.1. Albero filogenetico basato su sequenze nucleotidiche parziali del gene pol di adenovirus ottenute in questo studio (contrassegnate da un cerchio e selezionati uno per cluster), ceppi di riferimento di AdVs di psittacidi (in grassetto) e ceppi di riferimento non di psittacidi recuperati da GenBank®.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

DISCUSSIONE

I risultati della nested PCR hanno rivelato un'alta prevalenza di infezione da adenovirus: complessivamente, su 95 uccelli testati, 72 sono risultati positivi, con una prevalenza del 75.8%. Gli AdVs sono stati rilevati in varie specie di psittacidi: calopsitta, inseparabile facciarosa, kakariki fronte rossa, pappagallo monaco, parrocchetto dal groppone rosso, parrocchetto dal collare e parrocchetto di Bourke. Secondo la nostra conoscenza, questa è la prima segnalazione di infezione da adenovirus nel parrocchetto dal collare e la prima caratterizzazione molecolare di adenovirus nel parrocchetto dal groppone rosso.

Il tipo di adenovirus più frequentemente rilevato è stato il PsAdV-2, appartenente al genere *Siadenovirus* – trovato nel 79.2% degli uccelli positivi. PsAdV-2 è stato identificato in tutte le specie allevate e, basandosi sulla letteratura disponibile, è stato trovato per la prima volta negli inseparabili facciarosa, nei parrocchetti dal groppone rosso e nei parrocchetti dal collare. Dai dati ottenuti nel nostro studio, il secondo adenovirus più frequentemente riscontrato è stato il duck adenovirus 1. Questo *Atadenovirus* è stato rilevato nel 9.7% dei pappagalli. L'infezione da DAdV-1 non è stata precedentemente segnalata negli psittacidi ma, a causa della potenziale capacità degli adenovirus di superare barriere specifiche di specie e cambiare ospiti (Phalen et al. 2019) e dell'alta resistenza ambientale e diffusione mondiale del virus (Smyth 2020), potrebbe essere stata introdotta in questo allevamento e aver infettato i parrocchetti. Infine, un altro *Siadenovirus*, il psittacine adenovirus 5 (PsAdV-5), è stato rilevato solo in due inseparabili facciarosa.

L'analisi molecolare degli adenovirus rilevati ha mostrato che le sequenze non classificate presentavano una bassa omologia nucleotidica e aminoacidica con le sequenze di adenovirus attualmente presenti nel database GenBank®, impedendo la loro classificazione con certezza tra i tipi attualmente identificati. Il criterio di demarcazione delle specie all'interno di ciascun genere della famiglia *Adenoviridae* si basa sull'analisi della matrice di distanza delle sequenze complete della DNA polimerasi che deve essere > 10-15% (Benkő et al. 2022). Nel nostro studio, abbiamo riscontrato distanze filogenetiche delle sequenze non classificate dal ceppo di riferimento più strettamente correlato variabili dal 4,4% al 42,3% suggerendo che potrebbero rappresentare nuovi tipi di AdVs.

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 (2021) Genomic characterisation of a highly divergent *Siadenovirus* (Psittacine *Siadenovirus* F) from the critically endangered orange-bellied parrot (*Neophema chrysogaster*). *Viruses* 13(9):1714
2. Benkő M, Aoki K, Arnberg N, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, Jones MS, Kaján GL, Kajon AE, Mittal SK, Podgorski II, San Martín C, Wadell G, Watanabe H, Harrach

- B (2022) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Adenoviridae*. J Gen Virol 103(3):001721
3. Fitzgerald SD (2020) Adenovirus Infections - Introduction. In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, pp. 321-322
 4. Hillis DM, Bull JJ (1993) An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst Biol 42(2):182-192
 5. Hulbert CL, Chamings A, Hewson KA, Steer PA, Gosbell M, Noormohammadi AH (2015) 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 93(8):287-292
 6. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008) NCBI BLAST: A better web interface. Nucleic Acids Res 36(Web Server issue):W5-W9
 7. Katoh H, Ogawa H, Ohya K, Fukushi H (2010) A review of DNA viral infections in psittacine birds. J Vet Med Sci 72(9):1099-1106
 8. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35(6):1547-1549
 9. Mori F, Touchi A, Suwa T, Itakura C, Hashimoto A, Hirai K (1989) Inclusion bodies containing adenovirus-like particles in the kidneys of psittacine birds. Avian Pathol 18(1):197-202
 10. Phalen DN, Agius J, Vaz FF, Eden JS, Setyo LC, Donahoe S (2019) 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 48(5):437-443
 11. Rautenschlein S, Mahsoub HM, Fitzgerald SD, Pierson FW (2020) Adenovirus infections – Hemorrhagic enteritis and related infections. In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, pp. 339-348
 12. Reed WM, Jack SW (2020) Adenovirus infections – Quail bronchitis. In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, pp. 348-352
 13. Smyth JA (2020) Adenovirus infections – *Atadenovirus* (Egg drop syndrome of chickens and related infections). In: Diseases of Poultry, 14th edn. Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell, pp. 332-339
 14. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22(22):4673-4680
 15. Wellehan JFX, Greenacre CB, Fleming GJ, Stetter MD, Childress AL, Terrell SP (2009) Siadenovirus infection in two psittacine bird species. Avian Pathol 38(5):413-417. <https://doi.org/10.1080/03079450903183660>
 16. Wellehan JFX, Johnson AJ, Harrach B, Benkő M, Pessier AP, Johnson CM, Garner MM, Childress A, Jacobson ER (2004) Detection and analysis of six lizard adenovirus by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses. J Virol 78(23):13366-13369
 17. Yang N, McLelland J, McLelland DJ, Clarke J, Woolford L, Eden P, Phalen DN (2019) 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 14(2):e0208674

ANALISI DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM IN CEPPI MULTIRE-SISTENTI DI *SALMONELLA INFANTIS* ISOLATI LUNGO LA FILIERA PRODUTTIVA DEL POLLO DA CARNE IN ITALIA

Musa L., Toppi V., Stefanetti V., Spata N., Rapi MC., Grilli G., Addis MF., Di Giacinti G., Franciosini MP., Casagrande Proietti P.

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

²Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Via S. Costanzo, 4, 06126, Perugia, Italia;

³Dipartimento di Scienze Umane e Promozione della Qualità della Vita, Università Telematica San Raffaele, Via di Val Cannuta, 247, 00166 Roma, Italia;

⁴Laboratorio di Malattie Infettive degli Animali (MiLab), University of Milan, 26900 Lodi, Italia;

⁵Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco, Torino, Italia.

Summary

The ability of *Salmonella* species to adhere to surfaces and form biofilms, leading to persistent environmental reservoirs, might represent a direct link between environmental contamination and food processing contamination. The purpose of this study was to investigate the biofilm-forming ability of 80 multidrug-resistant (MDR) and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Salmonella enterica* serovar *Infantis* strains isolated from the broiler food chain production through whole genome sequencing (WGS), PCR, and morphotype association assays. Biofilm formation was quantified by testing the strains at two different temperatures, using 96-well polystyrene plates. The rough and dry colony (rdar) morphotype was assessed visually on Congo red agar (CRA) plates. Based on our results, all tested *S. Infantis* strains produced biofilm at 22 °C with an rdar morphotype, while at 37 °C, all the isolates tested negative, except one positive. Most isolates (58.75%) exhibited strong biofilm production, while 36.25% showed moderate production. Only 5 out of 80 (6.25%) were weak biofilm producers. WGS analysis showed the presence of the *fim* cluster (*fimADF*) and the *csg* cluster (*csgBAC* and *csgDEFG*), also described in *S. Typhimurium*, which are responsible for fimbriae production. PCR demonstrated the presence of *csgD*, *csgB*, and *fimA* in all 80 *S. Infantis* strains. To our knowledge, this is the first study comparing the effects of two different temperatures on the biofilm formation capacity of ESBL producing *S. Infantis* from the broiler production chain. This study highlights that the initial biofilm components, such as curli and cellulose, are specifically expressed at lower temperatures. It is important to emphasize that within the broiler farm, the environmental temperature ranges between 18–22 °C, which is the optimum temperature for in vitro biofilm formation by *Salmonella* spp. This temperature range facilitates the expression of biofilm-associated genes, contributing to the persistence of *S. Infantis* in the environment. This complicates biosecurity measures and makes disinfection protocols on the farm and in the production chain more difficult, posing serious public health concerns.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Salmonella* rappresentano una minaccia per la salute pubblica, in particolare quelle causate da sierotipi di *Salmonella enterica* non tifoidea [1]. Gli alimenti di origine animale, in particolare le uova e la carne avicola, costituiscono i principali veicoli di trasmissione delle infezioni da *Salmonella* [2]. Negli ultimi anni, i programmi di sorveglianza della *Salmonella*, soprattutto nel settore avicolo (ad esempio, nell'UE), hanno determinato cambiamenti significativi nelle tendenze

della salmonellosi di origine alimentare e nei sierotipi associati [3]. Il pollame, in particolare polli e tacchini, sono considerati portatori senza manifestare sintomi evidenti, dando luogo a infezioni subcliniche o rendendo gli animali portatori sani. Dal 2010, si è registrato un notevole aumento della prevalenza di *S. Infantis*, che dal 2014 è diventato il serovar più frequentemente isolato nella produzione di polli da carne in numerosi Stati Membri. Attualmente, i polli da carne e i loro derivati (carne e prodotti a base di carne) rappresentano il 95% degli isolati di *S. Infantis* [4]. Di particolare rilevanza è la capacità di *S. Infantis* di adottare diverse strategie genetiche che ne potenziano l'adattabilità epidemiologica. Tali strategie includono l'acquisizione e la trasmissione della resistenza antimicrobica (AMR), la presenza di geni mobili di virulenza e la capacità di formare biofilm [5,6,7].

L'incremento dell'impatto delle infezioni da *S. Infantis* è ulteriormente complicato dalla comparsa di resistenza nei confronti degli "antimicrobici di importanza critica" (CIA), nonché dall'emergere di ceppi multiresistenti (MDR) isolati da animali destinati alla produzione alimentare e dai loro derivati [8]. Questi ceppi risultano resistenti a penicilline, cefalosporine e fluorochinoloni, e frequentemente beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL). Le cefalosporine di terza e quarta generazione rappresentano i farmaci di prima scelta per il trattamento delle infezioni batteriche gravi, e la possibilità di fallimento terapeutico negli esseri umani aumenta durante le infezioni causate da batteri come *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli* ESBL [8].

Nonostante sia un patogeno intestinale, *S. Infantis* è in grado di persistere facilmente al di fuori dell'ospite mediante la produzione di biofilm, un meccanismo di adattamento cruciale per la sopravvivenza. Inoltre, diversi studi hanno evidenziato che la formazione di biofilm conferisce una maggiore tolleranza a diversi stressori (temperatura, pH, disinfezione, antibiotici, ecc.) incontrati sia negli ambienti ospiti che non ospiti [9]. Per questo motivo, l'eradicazione di *Salmonella* spp. all'interno di un ambiente, come l'allevamento, risulta particolarmente complessa. I batteri presenti nel biofilm rappresentano una sfida significativa per la loro eliminazione rispetto alle cellule planctoniche, in quanto sono protetti in modo efficace da antibiotici, disinfettanti, dalla risposta immunitaria dell'ospite e da condizioni di stress ambientale [10]. Di conseguenza, *Salmonella* può persistere su superfici abiotiche in allevamenti e impianti di lavorazione degli alimenti, progredendo lungo la catena alimentare tramite contaminazione degli alimenti. Diversi fattori di virulenza svolgono un ruolo chiave nella patogenesi delle infezioni da *Salmonella*, tra cui flagelli, capsule, plasmidi, sistemi di adesione e sistemi di secrezione di tipo III (TTSS), codificati nelle isole di patogenicità SPI-1, SPI-2 e altre [11]. *Salmonella* spp. necessita dell'espressione di numerosi geni per manifestare pienamente la sua virulenza, molti dei quali sono localizzati nelle isole di patogenicità (PAIs) all'interno del cromosoma. Tali isole di patogenicità sono presenti anche in *S. Infantis*. La cellulosa e le fimbrie curli costituiscono i principali componenti strutturali del biofilm. La matrice polimerica extracellulare riveste un ruolo cruciale, poiché deve essere degradata o dissolta durante le procedure di sanificazione per consentire ai disinfettanti di raggiungere e eliminare efficacemente le cellule batteriche [12]. Le fimbrie curli rappresentano un componente fondamentale della matrice extracellulare di *Salmonella*, la cui assenza determina una significativa riduzione della capacità di formazione del biofilm. Baugh et al. (2012) hanno dimostrato che la repressione trascrizionale dei due operoni coinvolti nella biosintesi delle curli è responsabile della loro mancata produzione nei mutanti con alterazioni nei sistemi di efflusso, con conseguente abolizione della formazione di biofilm [13,14]. Le variazioni nell'espressione della cellulosa e delle fimbrie curli determinano lo sviluppo di differenti morfotipi. In vitro, il morfotipo rdar (rosso, secco e ruvido) è caratterizzato dalla co-espressione di entrambi questi componenti, contribuendo alla formazione di una matrice extracellulare strutturata e altamente aderente. Questo fenotipo è strettamente associato all'espressione dei geni *csgD* e *adrA*. In particolare, *csgD*, codificato all'interno dell'operone *csgDEFG*, svolge un ruolo chiave nella regolazione della formazione del biofilm, coordinando l'espressione di diversi fattori essenziali per questo processo [15].

L'obiettivo del presente studio è stato quello di analizzare la capacità di formazione di biofilm di 80 ceppi di *Salmonella* Infantis multiresistenti e produttori di ESBL, isolati lungo la filiera produttiva del pollo da carne. A tal fine, sono stati adottati metodi di biologia molecolare come PCR e il sequenziamento intero del genoma per identificare i geni implicati nella produzione di biofilm.

MATERIALI E METODI

2.1. Raccolta e identificazione degli isolati

In questo studio sono stati analizzati 80 ceppi di *S. Infantis*, selezionati per la produzione di ESBL e caratterizzati fenotipicamente in relazione alla resistenza agli antibiotici. Gli isolati, raccolti tra il 2016 e il 2017 lungo la filiera di produzione del pollo da carne (allevamenti e macelli) in Italia, sono stati prelevati seguendo le procedure standard ISO (ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020) [41]. Per la conservazione a lungo termine, i ceppi sono stati stoccati in Tryptic Soy Broth (TSB) supplementato con il 15% (v/v) di glicerolo a -80 °C. Successivamente, le colture batteriche sono state inoculate in brodo Luria Bertani (LB) e incubate a 37 °C per 18 ore sotto agitazione orbitale (200 rpm).

2.2. Valutazione dell'adesione cellulare

La capacità di adesione e formazione di biofilm è stata valutata secondo il metodo descritto da Stepanovic et al. (2007), con le modifiche riportate di seguito. In sintesi, gli isolati sono stati analizzati in quadruplicato attraverso tre esperimenti indipendenti, utilizzando reagenti e terreni di coltura preparati per ciascun ciclo sperimentale [43,44]. Prima di ogni esperimento, le colture batteriche sono state seminate su agar Mueller-Hinton e incubate per 18 ore a 37 ± 1 °C per verificarne la purezza. Successivamente, i batteri sono stati inoculati in brodo LB (contenente 10 g/L di triptone e 5 g/L di estratto di lievito) con basse concentrazioni di NaCl (<0,5%) (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, TE, Italia).

2.2.1. Analisi mediante piastre multi-well

La produzione di biofilm è stata valutata utilizzando piastre multiwell in polistirene a 96 pozzetti, dotate di coperchio sterile e trattate per la coltura tissutale (BD Falcon, Torino, Italia). Per ogni test, 100 µL di sospensione batterica standardizzata (1×10^5 CFU/mL) sono stati distribuiti nei pozzetti di una micropiastre a fondo piatto e incubati per 48 ore a 23 ± 1 °C e 37 °C [23]. Come controllo negativo è stato impiegato il solo brodo LB, mentre come controllo positivo è stato utilizzato il ceppo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, noto per la sua elevata capacità di formazione di biofilm, al fine di garantire la validità dei risultati. Dopo l'incubazione, il surnatante è stato rimosso e ciascun pozzetto è stato accuratamente lavato tre volte con 300 µL di PBS sterile (pH 7,2) (Sigma, St. Louis, MI, USA), avendo cura di preservare l'integrità dei biofilm eventualmente formati. Le piastre sono state incubate a 60 °C per 60 minuti per favorire l'asciugatura. Successivamente, è stato aggiunto un volume standard di 150 µL di cristal violetto 0,5% (Sigma, St. Louis, MI, USA) e lasciato agire per 15 minuti a temperatura ambiente per consentire la colorazione del biofilm. L'eccesso di colorante è stato rimosso mediante aspirazione, seguito da due lavaggi con acqua distillata per eliminare eventuali residui. La micropiastre è stata successivamente asciugata per 30 minuti a 37 °C. Le cellule aderenti sono state risolubilizzate in 150 µL di etanolo al 96%, con la micropiastre mantenuta coperta per prevenire l'evaporazione, e incubate a temperatura ambiente per 30 minuti. Infine, la densità ottica di ciascun pozzetto è stata misurata a 570 nm (OD570) utilizzando un lettore di micropiastre (Tecan Group Ltd., Männedorf, Svizzera).

2.2.2. Analisi della quantificazione del biofilm

In conformità con il metodo descritto da Stepanovic et al., è stato stabilito un valore soglia (cut-off) per distinguere i ceppi produttori di biofilm da quelli non produttori, al fine di garantire un'inter-

pretazione accurata dei risultati ottenuti [44]. La quantificazione della produzione di biofilm è stata effettuata determinando il valore di cut-off della densità ottica (ODc), calcolato come la media della densità ottica a 570 nm (OD570) del controllo negativo, sommata a tre volte la deviazione standard (SD) dello stesso controllo (ODc = media OD570 del controllo negativo + 3 SD del controllo negativo). Il valore finale di OD per ciascun ceppo testato è stato calcolato come la media della sua OD, al netto del valore di ODc. Questo approccio ha consentito di classificare i ceppi batterici in base ai valori di OD570 ottenuti, secondo le seguenti categorie: non produttori di biofilm (OD570 ≤ ODc); deboli produttori di biofilm (ODc < OD570 ≤ 2 × ODc); moderati produttori di biofilm (2 × ODc < OD570 ≤ 4 × ODc); forti produttori di biofilm (OD570 > 4 × ODc) [44].

2.3. Analisi del morfotipo di *S. Infantis*

La caratterizzazione del morfotipo del biofilm è stata effettuata per tutti i ceppi di *Salmonella* mediante coltura su piastre di agar Congo Red (CRA), basandosi sulle caratteristiche morfologiche delle colonie. L'analisi del morfotipo è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Römbling e Rohde (1999), con alcune modifiche [15]. In breve, 5 µL di colture overnight sono stati inoculati su terreno LB agar privo di NaCl (estratto di lievito 5 g/L, bacto-triptone 10 g/L, agar 15 g/L), integrato con 40 µg/mL di Congo Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) e 20 µg/mL di Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich). Le piastre sono state incubate a 22 °C per 96 ore. In base alla morfologia delle colonie, i ceppi sono stati classificati in quattro distinti morfotipi: rdar (rosso, secco e rugoso), indicativo della produzione combinata di fimbrie curli e cellulosa; bdar (marrone, secco e rugoso), caratterizzato dalla produzione esclusiva di fimbrie curli; pdar (rosa, secco e rugoso), associato alla produzione esclusiva di cellulosa; e saw (liscio e umido), che indica l'assenza di fimbrie curli e cellulosa. Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato per garantire l'affidabilità dei risultati [16,45].

2.4. Caratterizzazione molecolare

2.4.1. Identificazione dei geni coinvolti nella produzione di biofilm.

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata da singole colonie utilizzando il GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania), seguendo le istruzioni del produttore, a partire da colture incubate overnight in TSB. La quantità e la qualità del DNA estratto sono state valutate mediante spettrofotometria (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) ed elettroforesi su gel di agarosio all'1%. Per l'identificazione dei geni coinvolti nella formazione del biofilm, tutti gli isolati sono stati sottoposti a PCR mirata per il rilevamento dei geni *fimA*, *csgB* e *csgD*, noti per il loro ruolo nell'adesione cellulare nelle fasi iniziali della formazione del biofilm, secondo protocolli precedentemente descritti [46,47,48] (Tabella 1). Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 25 µL, contenente 0,5 µM di ciascun primer. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 è stato utilizzato come controllo negativo per tutti e tre i geni analizzati.

Tabella 1. Geni target coinvolti nei meccanismi di adesione cellulare e relative sequenze primer.

Target Genes	Sequence of Primers (5'–3')	Product Length	References
<i>csgD</i>	F: TCCTGGTCTTCAGTAGCGTAA R: TATGATGGAAGCGGATAAGAA	168 bp	[48]
<i>csgB</i>	F: ATCAGGCGGCCATTATTGGTCAAG R: TGCTGTTTTCTGCGTACCGTACTG	275 bp	[47]
<i>fimA</i>	F: TGCCTTTCTCCATCGTCC R: TGCGGTAGTGCTATTGTCC	134 bp	[46]

2.4.2. Sequenziamento intero del genoma

Il DNA genomico di quattro isolati di *Salmonella* *Infantis* (tre forti produttori di biofilm e uno moderato) è stato utilizzato per la preparazione delle librerie, impiegando un kit commerciale (Nextera XT, Illumina, San Diego, CA, USA). Gli isolati analizzati in questo studio derivano da un precedente lavoro in cui erano stati sequenziati e investigati per la presenza di geni di resistenza agli antibiotici [7]. Il sequenziamento delle librerie è stato eseguito utilizzando la tecnologia Illumina MiSeq con letture paired-end. La qualità delle letture grezze è stata valutata con FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, accesso: 15 gennaio 2024), eliminando quelle con qualità inferiore (Phred score < 20) e lunghezza inferiore a 70 nucleotidi. Le letture processate (coverage 100×) sono state assemblate de novo utilizzando SPAdes v. 3.14 [49]. I contig generati sono stati elaborati con CSAR v. 1.1.1 per costruire scaffold di lunghezza superiore a 200 nucleotidi. Successivamente, la qualità dell'assemblaggio genomico è stata verificata con QUAST v. 4.3 [50] e le sequenze sono state annotate tramite Prokka v. 1.12 [51]. Infine, le sequenze genomiche sono state analizzate per l'identificazione di geni associati alla produzione di biofilm.

RISULTATI

3.1. Quantificazione del biofilm

I risultati ottenuti dall'analisi degli 80 ceppi di *S. Infantis* a 22 °C e 37 °C sono riportati nella Figura 1. Complessivamente, tutti gli isolati hanno mostrato la capacità di formare biofilm a 22 °C, sebbene con diversi gradi di produzione (Tabella S1; Figura 1). Nel dettaglio, 47 dei 80 isolati (58,75%) hanno evidenziato una produzione elevata di biofilm, 29 su 80 (36,25%) una produzione moderata, mentre solo 4 su 80 (6,25%) sono stati classificati come deboli produttori di biofilm. Al contrario, dei 79 isolati testati a 37 °C, tutti gli isolati sono classificati come negativi, ad eccezione di un singolo isolato che ha mostrato una debole produzione di biofilm.

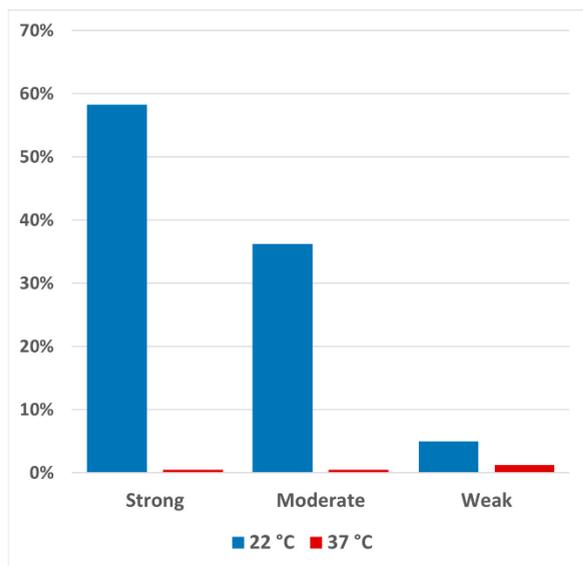


Figura 1. Distribuzione percentuale dei 80 isolati di *S. Infantis* analizzati in questo studio in relazione alla capacità di produzione di biofilm a 22 °C e 37 °C.

3.1. Valutazione del morfotipo di *S. Infantis*

Le caratteristiche morfologiche degli isolati testati mediante il metodo CRA sono riportate nella Figura 2. Poiché tutti gli isolati hanno prodotto biofilm a livelli variabili a 22 °C, tutti hanno manifestato l'espressione del morfotipo rdar (Figura 2A). Sono state osservate tre regioni distinte, caratteristiche del morfotipo rdar (Figura 2B; dall'alto verso il basso): una regione periferica liscia e bianca, priva di legame con il Congo red; una zona rossa e liscia, di dimensioni ristrette, che suggerisce una moderata espressione di curli e cellulosa; infine, una vasta regione centrale, caratterizzata da una superficie ruvida con pieghe evidenti e una colorazione rossa intensa, che indica un'elevata espressione di curli e cellulosa.

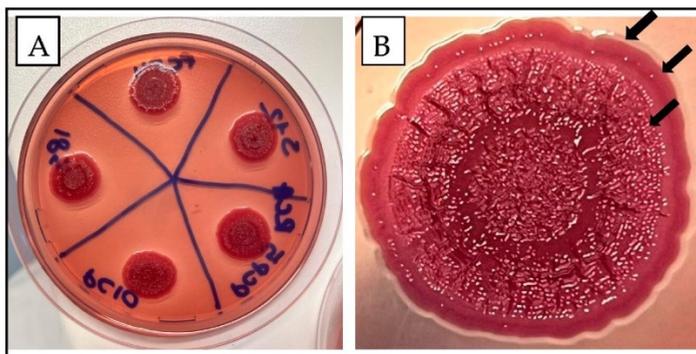


Figura 2. Il morfotipo rdar degli isolati di *S. Infantis*. (A) rappresenta il morfotipo di tutti gli isolati analizzati (80 ceppi). (B) illustra le tre zone distinte osservate nel morfotipo rdar.

3.2. Caratterizzazione molecolare

L'analisi PCR ha evidenziato che tutti e 80 i ceppi di *S. Infantis* risultano positivi per i geni *csgD*, *csgB* e *fimA*. Successivamente, l'analisi tramite sequenziamento completo del genoma (WGS) di quattro ceppi, comprendenti tre forti produttori di biofilm e uno con produzione moderata, ha fornito i seguenti risultati: i tre forti produttori di biofilm presentavano il cluster genico *fim* (ADF), e uno di essi esprimeva anche il cluster CSG (*csgA*, *csgB*, *csgC*, *csgD*, *csgE*, *csgF*, *csgG*). Il ceppo produttore di biofilm moderato esprimeva esclusivamente il gene *fimA1*.

DISCUSSIONE

La resistenza agli antimicrobici da parte dei microrganismi costituisce una problematica di portata globale di notevole rilevanza, soprattutto a causa della rapida diffusione di *Salmonella Infantis* e del suo impatto sulla salute umana, animale e ambientale. La resistenza agli antimicrobici, associata alla formazione di biofilm costituisce un fenomeno altamente complesso e problematico [16]. Il biofilm, infatti, offre un ambiente protetto per le cellule tolleranti e persistenti, mentre la matrice extracellulare del biofilm agisce come una barriera, rappresentando il principale ostacolo all'eradicazione dei biofilm in diverse aree degli allevamenti. Questo fenomeno compromette l'efficacia delle misure di biosicurezza interna, favorendo l'insorgenza di infezioni subcliniche croniche e causando perdite economiche significative [17]. Inoltre, la formazione di biofilm da parte di *S. Infantis* contribuisce in maniera significativa alla contaminazione crociata degli alimenti, con impatti negativi sull'intera catena di produzione alimentare [18]. *Salmonella Infantis* è riconosciuto come un sierotipo emergente a livello europeo, con una prevalenza diffusa nell'industria avicola. Attualmente, rappresenta

uno dei sierotipi più frequentemente isolati, non solo negli allevamenti di polli da carne e nei relativi prodotti, ma anche negli allevamenti di tacchini e nei loro derivati [19,20].

Secondo una recente metanalisi, gli isolati di *S. Infantis* multiresistenti (MDR) sono maggiormente segnalati nella carne di pollo (68,3%), in particolare nei prodotti come pollo grigliato, fegato, cosce e sovracosce [21,22]. A nostra conoscenza, questo rappresenta il secondo studio condotto su ceppi di *S. Infantis* isolati lungo la filiera produttiva del pollo da carne e il primo realizzato in Italia. Tuttavia, lo studio precedente si è concentrato esclusivamente su ceppi MDR, senza considerare quelli ESBL [23].

Nel presente studio, abbiamo analizzato la capacità di formazione del biofilm a 22 °C e 37 °C, con l'obiettivo di valutare l'influenza delle condizioni ambientali su questo fenomeno in *S. Infantis*. In particolare, la temperatura di 22 °C è stata selezionata per replicare le condizioni ambientali tipiche degli allevamenti di polli da carne, mentre la temperatura di 37 °C è stata utilizzata in parallelo, poiché rappresenta la temperatura ottimale di crescita delle Enterobacteriaceae negli ospiti vertebrati omeotermi. I risultati ottenuti hanno mostrato che tutte le *S. Infantis* sono in grado di produrre biofilm a 22 °C, mentre non hanno mostrato capacità di adesione e aggregazione a 37 °C. La maggior parte degli studi presenti in letteratura ha focalizzato l'attenzione sulla formazione di biofilm in sierotipi come *Salmonella* Derby, *S. Mbandaka* e *S. Enteritidis*. In particolare, Lamas et al. (2016) hanno valutato la capacità di produzione di biofilm in 67 ceppi di *Salmonella* isolati da allevamenti avicoli [24]. L'analisi è stata condotta a quattro diverse temperature (6 °C, 20 °C, 28 °C e 37 °C) e in condizioni di elevata e ridotta disponibilità di nutrienti. I risultati hanno mostrato che *S. enterica* subsp. *arizonae* e *S. Typhimurium* presentavano una maggiore capacità di formazione di biofilm a 20 °C. Studi precedenti hanno confermato che la capacità di formazione di biofilm da parte di *S. Typhimurium* si manifesta principalmente a temperature inferiori ai 25 °C [25,26]. I risultati del presente studio su *S. Infantis* sono in linea con quanto riportato per altri sierotipi di *Salmonella enterica*, poiché tutti i ceppi analizzati hanno mostrato capacità di produzione di biofilm a 22 °C. È fondamentale sottolineare la stretta relazione tra la formazione di biofilm e le condizioni ambientali negli allevamenti avicoli. In particolare, una temperatura compresa tra 18 °C e 22 °C rappresenta un intervallo ottimale per la formazione di biofilm da parte di *S. Infantis*, suggerendo implicazioni rilevanti per le strategie di biosicurezza e gestione degli allevamenti. I risultati ottenuti suggeriscono che *S. Infantis* adotta la produzione di biofilm come strategia di sopravvivenza in condizioni di stress, quali basse temperature e scarsa disponibilità di nutrienti. Studi precedenti hanno evidenziato che *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* è in grado di persistere all'interno dei biofilm negli ambienti di produzione alimentare, favorendo così la contaminazione crociata degli alimenti e compromettendone la sicurezza per il consumo umano [27]. D'altra parte, questa marcata differenza nella capacità di formazione di biofilm potrebbe essere attribuita a una maggiore adesione cellulare alle basse temperature [28]. Nguyen et al. (2014) hanno dimostrato che il tasso iniziale di formazione di biofilm aumenta all'aumentare della temperatura e del pH; tuttavia, dopo 240 ore, il numero di cellule aderenti diminuisce con l'incremento della temperatura.

Questo fenomeno potrebbe essere spiegato dalla produzione di fimbrie aggregative sottili (*thin aggregative fimbriae*) nei ceppi di *S. Infantis*, la cui espressione risulta influenzata dalle condizioni termiche dell'ambiente [29,30]. Nel presente studio, tutti i ceppi di *S. Infantis* analizzati risultavano portatori del gene *csgD*, responsabile della produzione di cellulosa e dell'espressione del morfotipo *rdar*, del gene *csgB*, che codifica la subunità principale delle fimbrie curli, e del gene *fimA*, che codifica la subunità principale delle fimbrie di tipo 1. L'espressione di questi geni determina un morfotipo caratterizzato dalla produzione della matrice extracellulare adesiva, costituita principalmente da cellulosa e fimbrie curli, strutture fondamentali per l'adesione e la formazione del biofilm [31]. Il gene *csgD* è un componente del complesso *csgBAC-csg-DEFG* e svolge un ruolo cruciale come regolatore trascrizionale principale nel controllo della

formazione del biofilm in *Salmonella*. Le fimbrie curli, prodotte in risposta all'attivazione di *csgD*, sono coinvolte nel processo di formazione del biofilm come strutture essenziali per l'inizio dell'adesione alle superfici. Il cluster genico delle fimbrie (*fim*) è costituito da un operone che codifica per componenti strutturali e regolatori, necessari per l'assemblaggio delle fimbrie. L'adesione batterica gioca un ruolo fondamentale nelle fasi iniziali dell'infezione. Le fimbrie, presenti sulla superficie batterica, facilitano l'attacco a recettori specifici localizzati nelle cellule ospiti o sulle superfici. Questi recettori si trovano in vari tessuti, inclusi il tratto urinario, il muco intestinale e le cellule epiteliali [32,33].

Quattro ceppi su 80 sono stati identificati come deboli produttori di biofilm, sebbene presentassero il morfotipo *rdar* e risultassero positivi per i geni *csgD*, *adrA* e *fimA*. Questo potrebbe suggerire che il processo di formazione del biofilm in *S. Infantis* possa essere influenzato da altri geni non inclusi in questa analisi. Secondo diversi studi, in condizioni di stress, la produzione di curli e cellulosa tende ad aumentare [34,35]. Il gene *csgD*, un regolatore cruciale della formazione del biofilm in *Salmonella*, controlla l'espressione dei principali componenti del biofilm e facilita la transizione tra i diversi stati comportamentali. Tuttavia, *csgD* presenta tipicamente un basso livello di trascrizione basale, e la sua espressione è fortemente influenzata da vari fattori ambientali, quali temperatura, livelli di ossigeno, nutrienti, osmolarità, etanolo, ferro e pH. Inoltre, il confronto del fenotipo *rdar* con altri sistemi di analisi del biofilm può risultare complesso [16].

Un'ulteriore considerazione riguarda i nostri risultati relativi ai deboli produttori di biofilm, che potrebbero derivare dall'applicazione di due metodologie differenti. Studi precedenti hanno dimostrato che il 30% del genoma funzionale di *S. Typhimurium* è regolato in modo differenziale tra colture su agar e in brodo. Questo rende ancora più complesso il confronto tra il fenotipo *rdar* e altri sistemi di analisi del biofilm, evidenziando l'importanza di una corretta interpretazione dei risultati e la necessità di considerare attentamente le condizioni sperimentali [36]. I nostri dati hanno mostrato che tutti i ceppi analizzati in questo studio, precedentemente identificati come MDR e positivi per ESBL, hanno presentato capacità di formare biofilm a diversi livelli. Questi risultati suggeriscono una correlazione positiva tra la capacità di formare biofilm e i meccanismi di resistenza agli antibiotici, in linea con quanto osservato in studi precedenti [37,38]. La formazione di biofilm può infatti aumentare la tolleranza agli antibiotici, conferendo una resistenza adattativa a questi agenti antimicrobici. Narasanna et al. (2017) hanno mostrato che il cefotaxime, a concentrazioni sub-inibitorie (sub-MIC), induce efficacemente la formazione di biofilm e promuove cambiamenti nella morfologia cellulare, alterando l'ultrastruttura e l'antigenicità dei microrganismi, nonché la loro capacità di aderire alle cellule epiteliali [39]. Un altro possibile fattore potrebbe essere la presenza di pompe di efflusso MDR o operoni MDR, che sono coinvolti sia nella resistenza agli antibiotici che nella formazione di biofilm [40]. Tuttavia, lo sviluppo di protocolli di disinfezione in situ (DP) per l'allevamento richiede una comprensione approfondita delle concentrazioni ottimali e dei tempi di esposizione necessari per una gestione efficiente dei patogeni all'interno dei biofilm. Questo è essenziale per ridurre la resistenza antimicrobica e affrontare i problemi legati ai biofilm lungo l'intera filiera alimentare. Le pratiche cliniche e industriali devono essere conformi agli standard per garantire coerenza, scalabilità, riproducibilità ed economicità, poiché i protocolli di disinfezione, anche alle concentrazioni raccomandate, potrebbero non essere in grado di inattivare completamente i microrganismi target all'interno dei biofilm, siano essi monoespecie o multi-specie [4].

CONCLUSIONI

La presenza di biofilm batterici negli ambienti di lavorazione degli alimenti costituisce una significativa preoccupazione per la salute pubblica, poiché i batteri all'interno dei biofilm risultano maggiormente protetti da vari stress esterni rispetto alle loro controparti planctoni-

che. Tale fenomeno evidenzia il legame diretto tra la contaminazione della catena di produzione alimentare e la formazione di biofilm batterici. Il nostro studio contribuisce ad ampliare le conoscenze sulla capacità di formazione di biofilm di ceppi MDR e ESBL di *S. Infantis* alle temperature tipiche della catena di produzione della carne avicola. Inoltre, rappresenta il primo studio della produzione di biofilm lungo la filiera di produzione avicola condotta in Italia. I protocolli di disinfezione e le misure di biosicurezza interna nell'allevamento del pollo da carne e negli impianti di macellazione potrebbero essere significativamente compromessi dalla capacità di *S. Infantis* di produrre il biofilm, la quale è potenziata dallo stress e dalle condizioni ambientali. L'espressione di curli e cellulosa, infatti, è fortemente influenzata dalla temperatura, con conseguente incremento della persistenza di questo batterio nell'ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Antunes, P.; Mourão, J.; Campos, J.; Peixe, L. Salmonellosis: The Role of Poultry Meat. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 110–121.
2. Majowicz, S.E.; Musto, J.; Scallan, E.; Angulo, F.J.; Kirk, M.; O'Brien, S.J.; Jones, T.F.; Fazil, A.; Hoekstra, R.M.; for the International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies. The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 882–889.
3. National Salmonella Surveillance|National Surveillance|CDC. Available online: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella-surveillance.html> (accessed on 15 May 2024).
4. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2022**, *20*, e07666.
5. Alba, P.; Leekitcharoenphon, P.; Carfora, V.; Amoruso, R.; Cordaro, G.; Di Matteo, P.; Ianzano, A.; Iurescia, M.; Diaconu, E.L.; ENGAGE-EURL-AR Network Study Group; et al. Molecular Epidemiology of Salmonella Infantis in Europe: Insights into the Success of the Bacterial Host and Its Parasitic pESI-like Megaplasmid. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, e000365.
6. Pradhan, J.; Mallick, S.; Mishra, N.; Patel, S.; Pradhan, J.; Negi, V.D. Chapter 26—Salmonella Biofilm and Its Importance in the Pathogenesis. In *Understanding Microbial Biofilms*; Das, S., Kungwani, N.A., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2023; pp. 447–459. ISBN 978-0-323-99977-9.
7. Casagrande Proietti, P.; Musa, L.; Stefanetti, V.; Orsini, M.; Toppi, V.; Branciarri, R.; Blasi, F.; Magistrali, C.F.; Capomaccio, S.; Kika, T.S.; et al. Mcr-1-Mediated Colistin Resistance and Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance in ESBL-Producing Salmonella Infantis Strains from a Broiler Meat Production Chain in Italy. *Antibiotics* **2022**, *11*, 728.
8. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017. *EFSA J.* **2019**, *17*, e05598.
9. Harrell, J.E.; Hahn, M.M.; D'Souza, S.J.; Vasicek, E.M.; Sandala, J.L.; Gunn, J.S.; McLachlan, J.B. Salmonella Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *10*, 624622.
10. Araújo, D.; Silva, A.R.; Fernandes, R.; Serra, P.; Barros, M.M.; Campos, A.M.; Oliveira, R.; Silva, S.; Almeida, C.; Castro, J. Emerging Approaches for Mitigating Biofilm-Formation-Associated Infections in Farm, Wild, and Companion Animals. *Pathogens* **2024**, *13*, 320.
11. Giaouris, E.; Nesse, L. Attachment of Salmonella Spp. to Food Contact and Product Surfaces and Biofilm Formation on Them as Stress Adaptation and Survival Strategies. In *Salmonella: Prevalence, Risk Factors and Treatment Options*; Nova Science Publish-

- ers: Hauppauge, NY, USA, 2015; pp. 111–136. ISBN 978-1-63463-651-3.
12. Simões, M.; Simões, L.C.; Machado, I.; Pereira, M.O.; Vieira, M.J. Control of Flow-Generated Biofilms with Surfactants: Evidence of Resistance and Recovery. *Food Bioprod. Process.* **2006**, *84*, 338–345.
 13. Baugh, S.; Ekanayaka, A.S.; Piddock, L.J.V.; Webber, M.A. Loss of or Inhibition of All Multidrug Resistance Efflux Pumps of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Results in Impaired Ability to Form a Biofilm. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2409–2417.
 14. Alav, I.; Sutton, J.M.; Rahman, K.M. Role of Bacterial Efflux Pumps in Biofilm Formation. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 2003–2020.
 15. Römling, U. Characterization of the Rdar Morphotype, a Multicellular Behaviour in Enterobacteriaceae. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 1234–1246.
 16. Simm, R.; Ahmad, I.; Rhen, M.; Le Guyon, S.; Römling, U. Regulation of Biofilm Formation in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Future Microbiol.* **2014**, *9*, 1261–1282.
 17. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.; Stoodley, P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95–108.
 18. Song, M.; Tang, Q.; Ding, Y.; Tan, P.; Zhang, Y.; Wang, T.; Zhou, C.; Xu, S.; Lyu, M.; Bai, Y.; et al. Staphylococcus Aureus and Biofilms: Transmission, Threats, and Promising Strategies in Animal Husbandry. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2024**, *15*, 44.
 19. Antonelli, P.; Belluco, S.; Mancin, M.; Losasso, C.; Ricci, A. Genes Conferring Resistance to Critically Important Antimicrobials in *Salmonella enterica* Isolated from Animals and Food: A Systematic Review of the Literature, 2013–2017. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *126*, 59–67.
 20. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC); European Food Safety Authority (EFSA); European Medicines Agency (EMA). Third Joint Inter-Agency Report on Integrated Analysis of Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Humans and Food-Producing Animals in the EU/EEA. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06712.
 21. Alvarez, D.M.; Barrón-Montenegro, R.; Conejeros, J.; Rivera, D.; Undurraga, E.A.; Moreno-Switt, A.I. A Review of the Global Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Subsp. *Enterica* Serovar *Infantis*. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *403*, 110297.
 22. Kalaba, V.; Golić, B.; Sladojević, Ž.; Kalaba, D. Incidence of *Salmonella* *Infantis* in Poultry Meat and Products and the Resistance of Isolates to Antimicrobials. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2017**, *85*, 012082.
 23. Pate, M.; Mičunovič, J.; Golob, M.; Vestby, L.K.; Ocepek, M. *Salmonella* *Infantis* in Broiler Flocks in Slovenia: The Prevalence of Multidrug Resistant Strains with High Genetic Homogeneity and Low Biofilm-Forming Ability. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 4981463.
 24. Lamas, A.; Fernandez-No, I.C.; Miranda, J.M.; Vázquez, B.; Cepeda, A.; Franco, C.M. Biofilm Formation and Morphotypes of *Salmonella enterica* Subsp. *Arizonae* Differs from Those of Other *Salmonella enterica* Subspecies in Isolates from Poultry Houses. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 1127–1134.
 25. Karaca, B.; Akcelik, N.; Akcelik, M. Biofilm-Producing Abilities of *Salmonella* Strains Isolated from Turkey. *Biologia* **2013**, *68*, 1–10.
 26. Schonewille, E.; Nesse, L.L.; Hauck, R.; Windhorst, D.; Hafez, H.M.; Vestby, L.K. Biofilm Building Capacity of *Salmonella enterica* Strains from the Poultry Farm Environment. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *65*, 360–365.

27. Galié, S.; García-Gutiérrez, C.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 315815.
28. Moraes, J.O.; Cruz, E.A.; Souza, E.G.F.; Oliveira, T.C.M.; Alvarenga, V.O.; Peña, W.E.L.; Sant'Ana, A.S.; Magnani, M. Predicting Adhesion and Biofilm Formation Boundaries on Stainless Steel Surfaces by Five *Salmonella enterica* Strains Belonging to Different Serovars as a Function of pH, Temperature and NaCl Concentration. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *281*, 90–100.
29. Nguyen, H.D.N.; Yang, Y.S.; Yuk, H.G. Biofilm Formation of *Salmonella* Typhimurium on Stainless Steel and Acrylic Surfaces as Affected by Temperature and pH Level. *LWT Food Sci. Technol.* **2014**, *55*, 383–388.
30. Stepanović, S.; Ćirković, I.; Mijač, V.; Švabić-Vlahović, M. Influence of the Incubation Temperature, Atmosphere and Dynamic Conditions on Biofilm Formation by *Salmonella* Spp. *Food Microbiol.* **2003**, *20*, 339–343.
31. Zogaj, X.; Nitz, M.; Rohde, M.; Bokranz, W.; Römling, U. The Multicellular Morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia Coli* Produce Cellulose as the Second Component of the Extracellular Matrix. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 1452–1463.
32. Sarowska, J.; Futoma-Koloch, B.; Jama-Kmiecik, A.; Frej-Madrzak, M.; Ksiączyk, M.; Bugla-Ploskonska, G.; Choroszy-Krol, I. Virulence Factors, Prevalence and Potential Transmission of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia Coli* Isolated from Different Sources: Recent Reports. *Gut. Pathog.* **2019**, *11*, 10.
33. Hedlund, M.; Wachtler, C.; Johansson, E.; Hang, L.; Somerville, J.E.; Darveau, R.P.; Svanborg, C. P Fimbriae-Dependent, Lipopolysaccharide-Independent Activation of Epithelial Cytokine Responses. *Mol. Microbiol.* **1999**, *33*, 693–703.
34. Yan, C.-H.; Chen, F.-H.; Yang, Y.-L.; Zhan, Y.-F.; Herman, R.A.; Gong, L.-C.; Sheng, S.; Wang, J. The Transcription Factor CsgD Contributes to Engineered *Escherichia Coli* Resistance by Regulating Biofilm Formation and Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13681.
35. Azam, M.W.; Khan, A.U. CRISPRi-Mediated Suppression of *E. Coli* Nissle 1917 Virulence Factors: A Strategy for Creating an Engineered Probiotic Using *csgD* Gene Suppression. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 938989.
36. Wang, Q.; Frye, J.G.; McClelland, M.; Harshey, R.M. Gene Expression Patterns during Swarming in *Salmonella* Typhimurium: Genes Specific to Surface Growth and Putative New Motility and Pathogenicity Genes. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 169–187.
37. Li, W.; Li, Y.; Liu, Y.; Shi, X.; Jiang, M.; Lin, Y.; Qiu, Y.; Zhang, Q.; Chen, Q.; Zhou, L.; et al. Clonal Expansion of Biofilm-Forming *Salmonella* Typhimurium ST34 with Multidrug-Resistance Phenotype in the Southern Coastal Region of China. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2090.
38. Zhou, X.; Li, M.; Xu, L.; Shi, C.; Shi, X. Characterization of Antibiotic Resistance Genes, Plasmids, Biofilm Formation, and In Vitro Invasion Capacity of *Salmonella* Enteritidis Isolates from Children with Gastroenteritis. *Microb. Drug Resist.* **2019**, *25*, 1191–1198.
39. Narasanna, R.; Chavadi, M.; Oli, A.; Chandrakanth, K. Effect of Subinhibitory Concentration of Cefetoxime on Biofilm Formation. *J. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *7*.
40. Lorusso, A.B.; Carrara, J.A.; Barroso, C.D.N.; Tuon, F.F.; Faoro, H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15779.
41. Proietti, P.C.; Stefanetti, V.; Musa, L.; Zicavo, A.; Dionisi, A.M.; Bellucci, S.; Mensa, A.L.; Menchetti, L.; Branciarri, R.; Ortenzi, R.; et al. Genetic Profiles and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* Infantis Strains Isolated in Italy in the Food Chain of Broiler Meat Production. *Antibiotics* **2020**, *9*, 814.

42. Pasteur Institut; WHO. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Available online: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf (accessed on 1 June 2024).
43. Stepanović, S.; Cirković, I.; Ranin, L.; Svabić-Vlahović, M. Biofilm Formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on Plastic Surface. *Lett. Appl. Microbiol.* **2004**, *38*, 428–432.
44. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899.
45. Karaca, B.; Buzrul, S.; Tato, V.; Akçelik, N.; Akçelik, M. Modeling and Predicting the Biofilm Formation of Different Salmonella Strains. *J. Food Saf.* **2013**, *33*, 503–508.
46. Yin, L.; Dai, Y.; Chen, H.; He, X.; Ouyang, P.; Huang, X.; Sun, X.; Ai, Y.; Lai, S.; Zhu, L.; et al. Cinnamaldehyde Resist Salmonella Typhimurium Adhesion by Inhibiting Type I Fimbriae. *Molecules* **2022**, *27*, 7753.
47. Lin, L.; Liao, X.; Li, C.-Z.; Abdel-Samie, M.; Cui, H. Inhibitory Effect of Cold Nitrogen Plasma on Salmonella Typhimurium Biofilm and Its Application on Poultry Egg Preservation. *LWT* **2020**, *126*, 109340.
48. Wang, H.; Dong, Y.; Wang, G.; Xu, X.; Zhou, G. Effect of Growth Media on Gene Expression Levels in Salmonella Typhimurium Biofilm Formed on Stainless Steel Surface. *Food Control* **2016**, *59*, 546–552.
49. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477.
50. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUASt: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075.
51. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069.



INDICE DEGLI AUTORI

A

Aceto S. 240
Addis MF. 293
Andolfatto C. 272
Anniballi F. 261
Archetti L.I. 102

B

Bacchin C. 118
Badiola I. 220
Baglioni A. 118, 149
Balestrieri R. 240
Bano L. 118, 149, 261, 266
Bianco L. 272
Biarnés M. 272
Blanco A. 272
Borchardt G. 118
Borrelli L. 178, 195, 236, 240
Bove A. 83, 92, 227
Bozzo G. 83, 92

C

Camarda A. 83, 92, 127, 227
Carlu C. 102
Casagrande Proietti P. 293
Casalino G. 83, 92, 227
Cataldi M. 178
Catania S. 211, 253
Catelli E. 157, 171, 200, 281, 287
Cavicchio P. 127
Cecchinato M. 164, 195, 200, 247, 272
Ceniti C. 178
Circella E. 83, 92, 127, 227
Colò B. 211, 253
Cordioli B. 118
Cordon R. 127

D

Dalla Favera F. 281
D'Amico F. 83, 92
Del Zozzo F. 102

De Nardi M. 200
Dipineto L. 195, 236, 240
D'Onghia F. 83, 127
Dosa G. 281
Drigo I. 118, 261, 266

F

Fasana S. 287
Fioretti A. 195, 236, 240
Fiorini L. 102
Franciosini MP. 293
Franzo G. 75, 164, 195, 200, 247, 272

G

Garavini G. 281
Garbuio M. 118, 149, 261, 266
Gastaldelli M. 211, 253
Genovese S. 266
Giacomazzo M. 227
Giacomelli M. 211, 253
Giordano V. 127, 227
Giovanardi D. 149
Gobbo E. 118
Gomez M. 220
Graziosi G. 157, 171, 200, 281, 287
Grilli G. 287, 293
Guerrini A. 102
Guolo A. 118, 261

H

Harper V. 102, 261, 266, 272

L

Laconi A. 149
Lavazza A. 83
Legnardi M. 164, 171, 200, 247, 272
Lizzi G. 157, 171, 200, 287
Lombardi M. 227
Lombardi R. 83
Longobardi M. 236
Lucibelli F. 240
Lupini C. 157, 171, 200, 281, 287

M

Mannelli A. 281
Martella V. 83
Martini G. 281
Mellace M. 178
Messina D. 83
Messo W. 171
Meuter A. 118
Minichino A. 240
Morales-Arce A.Y. 253
Moschioni C. 261
Musa L. 287, 293
Muscatello V.L. 102

N

Nai G. 253
Napolitano M. 171
Noviello E. 195

P

Pace A. 195, 236
Pedrazzoli S. 200, 287
Pellegrini F. 83
Perna V. 92, 227
Petrella A. 127
Picchi M. 211
Piccirillo A. 149
Poletto F. 164, 200, 247, 272
Prataviera D. 211, 253
Prioletti M. 127
Pugliese N. 127, 227

Q

Quaglia G. 157, 171, 200, 287

R

Ramon L. 272
Rapi M.C. 287
Rapi MC. 293
Righetti V. 253
Rinaldi E. 211

Romito D. 92, 127
Rubio J. 220

S

Salierno D. 92, 127, 227
Samarelli R. 127
Santaniello A. 195, 236, 240
Sapio M. 240
Sartore P. 164, 247
Scalfaro C. 261
Serra V. 102
Sisquella L. 220
Spata N. 293
Stefanetti V. 293
Stefani E. 253

T

Taglieri S. 261
Tedesco D.E.A. 102
Tilocca B. 178
Tolini C. 83
Tomasoni R. 157, 171
Tondo A. 211
Tonon E. 266
Toppi V. 293
Trevisani G. 281
Tucciarone C.M. 164, 195, 200, 247, 272

V

Vanyò L. 220
Vedana M. 118, 149
Viel L. 149, 266

Z

Zanardello C. 149
Zandonà L. 118, 149, 261, 266

LET YOUR
VACCINATION PLAN

B R E A T H E

RESPIVAC® aMPV

L'unico vaccino contro l'aMPV che può essere
sommministrato in **ovodeposizione**

RESPIVAC® aMPV. Liofilizzato per sospensione oculonasale/per uso in acqua da bere per polli. **COMPOSIZIONE PER DOSE:** Metapneumovirus aviare vivo, sottotipo B, ceppo 1062, 10^{14} - 10^{14} CCID₅₀/dose (*CCID₅₀: dose infettante coltura cellulare 50%). **SPECIE DI DESTINAZIONE:** Polli. **INDICAZIONI PER L'USO:** Immunizzazione attiva dei polli per ridurre l'effetto nocivo del metapneumovirus aviare virulento sull'attività ciliare, che può manifestarsi con segni clinici respiratori. Inizio dell'immunità: 3 settimane dopo la vaccinazione. Durata dell'immunità: 9 settimane dopo la vaccinazione. **EVENTI AVVERSI:** Nessuno. **VIE DI SOMMINISTRAZIONE E POSOLOGIA:** Somministrare una dose di vaccino per via oculonasale (mediante somministrazione spray) o in acqua da bere. Lo spray può essere usato a partire da 1 giorno di età e l'acqua da bere a partire dai 7 giorni di età. Per prolungare l'immunità, i polli possono essere vaccinati ogni 9 settimane. Il veterinario deve stabilire lo schema di vaccinazione ottimale in base alla situazione epidemiologica locale. **TEMPI DI ATTESA:** Zero giorni. **PRECAUZIONI PARTICOLARI PER LA CONSERVAZIONE:** Conservare e trasportare in frigorifero (2 °C - 8 °C). Non congelare. Proteggere dalla luce. Periodo di validità del medicinale veterinario confezionato per la vendita: 2 anni. Periodo di validità dopo ricostituzione conformemente alle istruzioni: 2 ore. **IMPIEGO DURANTE LA GRAVIDANZA, L'ALLATTAMENTO O L'OVODEPOSIZIONE:** Volatili in ovodeposizione: la sicurezza di RESPIVAC® aMPV è stata stabilita durante l'ovodeposizione. **CONFEZIONI:** Scatola di cartone con 1 flaconcino di liofilizzato contenente 1.000 dosi. Scatola di cartone con 1 flaconcino di liofilizzato contenente 2.000 dosi. Scatola di cartone con 1 flaconcino di liofilizzato contenente 5.000 dosi. Scatola di cartone con 10 flaconcini di liofilizzato contenenti 2.000 dosi. Scatola di cartone con 10 flaconcini di liofilizzato contenenti 5.000 dosi. Scatola di cartone con 10 flaconcini di liofilizzato contenenti 10.000 dosi. Scatola di cartone con 10 flaconcini di liofilizzato contenenti 10.000 dosi. È possibile che non tutte le confezioni siano commercializzate. **NUMERO DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** EU/2/24/314/001-008. **NOME DEL TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** Laboratorios Hipra, S.A. Avda. la Selva, 135. 17170 Amer (Girona), Spagna. Tel.: +34 972 43 06 60. **CLASSIFICAZIONE DEI MEDICINALI VETERINARI:** Medicinale veterinario soggetto a prescrizione. **SOLO PER USO VETERINARIO. USARE I MEDICINALI IN MODO RESPONSABILE. TENERE FUORI DALLA VISTA E DALLA PORTATA DEI BAMBINI.**



**Il vostro partner
per una gestione
affidabile della
salute del
pollame**



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.

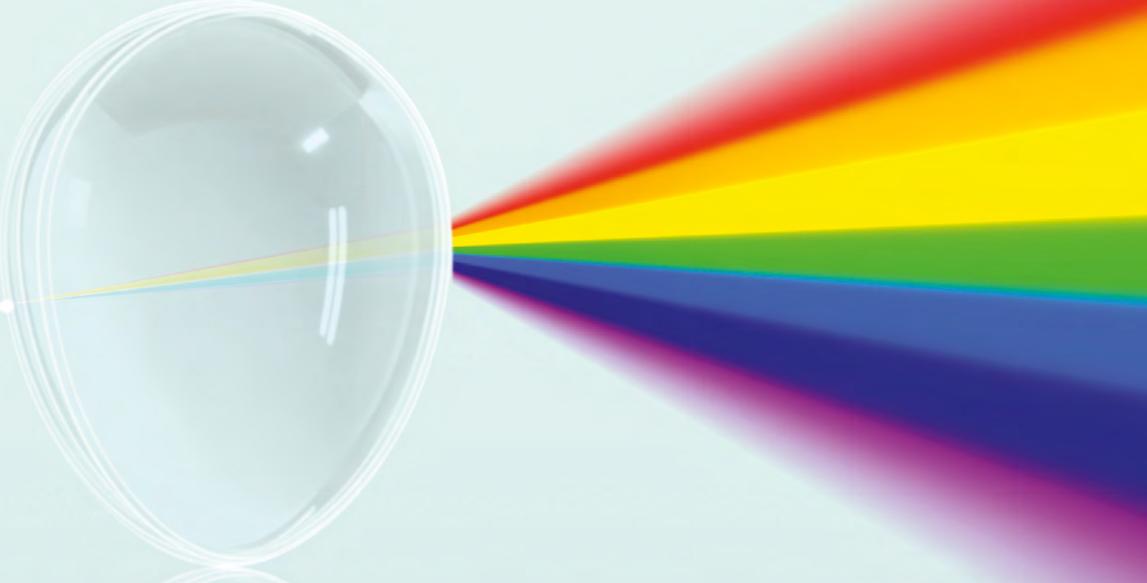
Promuovendo l'integrità dell'intestino, **BACTOCELL** aiuta la formazione di gusci più robusti e riduce il numero degli scarti.

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

A clear glass petri dish is shown in the upper left, with a thin white line extending from its left edge. From the right side of the dish, a vibrant rainbow spectrum of light (red, orange, yellow, green, blue, purple) radiates outwards, filling the right side of the frame against a light blue background.

Potenzia il tuo spettro di protezione

Studiato per soddisfare le necessità degli animali di oggi.

-  Combinazioni di antigeni ottimizzate per coprire un ampio range di patologie.
-  Utilizzo di ceppi multipli del medesimo patogeno per garantire una protezione più ampia.
-  Antigeni aggiornati per combattere meglio i ceppi attualmente circolanti.
-  Dosaggio ridotto a 0,3 ml: più maneggevole, ridotta reazione vaccinale e maggior attenzione al benessere animale.

NOBILIS MULTIRIVA™ - MOLTEPLICI VANTAGGI PER TE. MOLTEPLICI VANTAGGI PER I TUOI ANIMALI.
METTITI IN CONTATTO COL TUO RAPPRESENTANTE DI ZONA MSD ANIMAL HEALTH PER SAPERNE DI PIÙ

Copyright © 2023 Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA and its affiliates.
All rights reserved. GL-MLT-230300002

www.msd-animal-health.com







IL NUOVO ELEMENTO DELLA NOSTRA FAMIGLIA È UN VELOCISTA¹

PER L'IMPOSTAZIONE DEL PIANO VACCINALE **CONSULTA SEMPRE
IL TUO MEDICO VETERINARIO**

Materiale riservato ai medici veterinari e agli allevatori professionisti.



Bibliografia

1. Brown et al., 2023. Early onset and duration of immunity of an HVT-IBD vaccine against virulent, variant, and very virulent infectious bursal disease challenges. WVPA Congress, Verona, Italy.

