



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2026



65° CONVEGNO NAZIONALE 11° SIMPOSIO SCIENTIFICO

**Verona (VR), 15 Maggio 2026
Ozzano dell'Emilia (BO), 10-11 Settembre 2026**

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2026**

Verona (VR), 15 Maggio 2026

Ozzano dell'Emilia (BO), 10-11 Settembre 2026

INDICE

<i>Prefazione</i>	pag. 15
-------------------------	----------------

ATTI DEL 65° CONVEGNO NAZIONALE SIPA

Verona (VR), 15 Maggio 2026

CONVEGNO

DALL'INCUBATOIO AL TERRITORIO: INNOVAZIONE E GESTIONE NEL CONTROLLO DELLE PATOLOGIE IN AMBITO AVICOLO

- HATCHERY PROBLEM-SOLVING FRAMEWORK
Tolga Erkus **pag. 18**
- LARINGOTRACHEITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA: AGGIORNAMENTI SU DIAGNOSI, MONITORAGGIO DELLA VACCINAZIONE ED EPIDEMIOLOGIA DEI CEPPI RECENTI
Alessio Bortolami **pag. 19**
- OLTRE L'EMERGENZA: IL MODELLO DEL GRUPPO TECNICO ILT NELLA GESTIONE DELLE PATOLOGIE DI TERRITORIO
Luigi Gavazzi e Salvatore Catania **pag. 20**
- AGGIORNAMENTI SULLA VACCINAZIONE PER HPAI IN ITALIA
Calogero Terregino **pag. 22**
- APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA IN PATOLOGIA AVIARE: L'INTEGRAZIONE DEI PERCORSI DIAGNOSTICI APPROPRIATI (PDA) NELLA RETE IIZZSS
Laura Fiorentini e Salvatore Catania **pag. 23**

ATTI DEL 11° SIMPOSIO SCIENTIFICO

Ozzano dell'Emilia (BO), 10-11 Settembre 2026

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- COMPARAZIONE DELLA CINETICA DI DIVERSI VACCINI 793B (GI-13) CONTRO IL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) SOMMINISTRATI AD UN GIORNO DI VITA IN COMBINAZIONE CON UN VACCINO MASS (GI-1)
Andolfatto C., Sartore P., Pezzotti R., Legnardi M., Poletto F., Baston R., Tucciarone C.M., Franzo G., Cecchinato M. **pag. 30**

- BOTULISMO DEL POLLAME: EVIDENZE RACCOLTE IN OLTRE 15 ANNI DI ATTIVITÀ IN UN LABORATORIO DIAGNOSTICO VETERINARIO
Zandonà L., Drigo I., Gobbo E., Rizzardi A., Vedana M., Genovese S., Guolo A., Garbuio M., Viel L., Bano L. pag. 36

- PROGETTARE LA SALUTE INTESTINALE PER RISULTATI PREVEDIBILI: *BACILLUS VELEZENSIS* PB6 E BUTIRRATO DI CALCIO INCAPSULATO A SUPPORTO DELLE PERFORMANCE ZOOTECNICHE NEI TACCHINI
Zalewska E., Czarniak P., Casiro S., Bukowska P. pag. 42

- CARATTERIZZAZIONE E PROPAGAZIONE DEL VIRUS DELLA EGG DROP SYNDROME '76 (EDS-76) DA FOCOLAI DI GALLINE OVAIOLE STATUNITENSIS
Carnaccini S., Wang H.Y., Abdallah A., Gadu E., Wilson D., Trimble L., Mouw M., Sato Y., El-Gazzar M., Caceres J.C. pag. 45

- MONITORAGGIO E QUANTIFICAZIONE MEDIANTE REALTIME PCR (QPCR) DELL'ESCREZIONE FECALE DI AVIAN POLYOMAVIRUS IN UN GIOVANE PAPPAGALLO ECLETTICO (ECLECTUS RORATUS) CON INFEZIONE SUBCLINICA
Casalino G., Messina D., Bove A., Lombardi R., Salierno D., Romito D., Camarda A., Circella E. pag. 47

- SIEROTIPIZZAZIONE, STUDIO DEI FATTORI DI VIRULENZA E DELL'ANTIMICROBICO-RESISTENZA DI CEPI PATOGENI DI *ESCHERICHIA COLI* AVIARI (APEC) ISOLATI NEL 2026 IN ALLEVAMENTI DI GALLINE OVAIOLE DA CONSUMO E RIPRODUTTORI PESANTI
Cirasella L., Fiorentini L., Perulli S., Siclari C., Barbieri I., Merialdi G., Brandi A., Fabbri G., Tosi G. pag. 54

- DISSEMINAZIONE AMBIENTALE DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA NEL NORD DELL'ALGERIA: EVIDENZE DALLA FAUNA SELVATICA COME BIOINDICATORE
Esposito E., Chabani S., Rezouani I. E., Dilmi S., Scarpellini R., Mondo E., Ivanova M., Otani S., Scaravelli D., Bakhouch B., Piva S., Felice V., Locatelli E., Alloni M., Sorice A., Grilli G. pag. 61

- EVOLUZIONE DELLA BIOSICUREZZA AVICOLA: INDAGINE CONOSCITIVA IN UN TERRITORIO DELLA REGIONE LOMBARDIA NEGLI ANNI 2017-2025
Felice V., Locatelli E., Alloni M., Sorice A., Grilli G. pag. 65

- EVOLUZIONE DI PIATTAFORME IN VITRO PER LO SCREENING DI ANTICOCIDICI NATURALI: APPLICAZIONE ALL'OLIO ESSENZIALE DI TIMO CONTRO EIMERIA TENELLA
Felici M., Tugnoli B., Piva A., Grilli E. pag. 82

- TIPIZZAZIONE RAPIDA E ROBUSTA DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV) MEDIANTE MACHINE LEARNING SENZA ALLINEAMENTO
Franzo G., Cecchinato M., Tucciarone C.M., Poletto F., Andolfatto C., Legnardi M. .. pag. 86

- MONITORAGGIO DELLA DIFFUSIONE E DELL'IMPATTO DEGLI AGENTI IMMUNODEPRESSIVI VIRALI NEL POLLO DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO LONGITUDINALE
Giacomelli M., Zambon I., Soncin M., Dall'Angelo A., Broggi M., Galbusera F., Pirota M., Barbuto B., Domizio A., Bottinelli M., Di Schiavi M.T., Marcolin S., Bertazzo V., Fusaro A., Zanardello C., Bortolami A. pag. 93

- PRIMA SEGNALEZIONE DI *STARLINGPOX VIRUS* IN PASSERIFORMI INANELLATI IN ITALIA
Graziosi G., Pace A., Sapio M., Dipineto L., Lupini C., Tomasoni R., Tatino F., Motta A., Santaniello A., Catelli E., Fioretti A., Borrelli L. pag. 102

- SORVEGLIANZA AEROBIOLOGICA DI PATOGENI E GENI DI RESISTENZA ANTIMICROBICA NEGLI ALLEVAMENTI AVICOLI: UN APPROCCIO ONE HEALTH
Catania A.M., Ioakeimidou M., Stella M.C., Scagliotti P.F., Gavazzi L., Castellina C., Grego E. pag. 108

- VALUTAZIONE IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI UN PRODOTTO FITOGENICO NEL CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI AVICOLA
Rapi M.C., Tinti P., Facchetti G., Uboldi O., Filipe J., Grilli G. pag. 115

- VALUTAZIONE DELLA SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA AVIARIA: LE PROSPETTIVE DEI VETERINARI
Martella L., Zago M., Crovato S., Catelli E., Lupini C., Capello K., Simonetto A., Cattoli G., Scolamacchia F., Mulatti P., De Nardi M. pag. 128

- EFFICACE INATTIVAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE MEDIANTE ELEVATE PRESSIONI IDROSTATICHE: UN APPROCCIO PROMETTENTE PER APPLICAZIONI VACCINALI
Quaglia G., Catelli E., Rocculi P., Morbarigazzi M., Lupini C. pag. 140

- EFFETTO SULLA REPLICAZIONE DI *SALMONELLA INFANTIS* NEI BROILER DELLE DIVERSE STRATEGIE DI CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI E DELL'IMMUNITÀ PASSIVA MATERNA INDOTTA DALLA VACCINAZIONE DEI RIPRODUTTORI CON VACCINO INATTIVATO CONTRO *SALMONELLA INFANTIS*
Tampieri M.G., Gallina G., Volorio A., Russo E. pag. 145

- PIGMENTAZIONE CUTANEA DEL BROILER COME INDICATORE DI COCCIDIOSI: VALUTAZIONE IN VIVO E CONFRONTO CON METODICHE GOLD STANDARD
Tomasoni R., Catelli E., Poluzzi A., Anfossi P., Lupini C. pag. 151

- CONFRONTO TRA CAMPIONAMENTO CONVENZIONALE E CAMPIONAMENTO DELL'ARIA PER LA RILEVAZIONE MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BURSAITE INFETTIVA (IBDV)
Tonellato F.R., Poletto F., Andolfatto C., Franzo G., Tucciarone C.M., Cecchinato M., Legnardi M. pag. 161

- MONITORAGGIO MOLECOLARE E SIEROLOGICO DELLA CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN POLLASTRE E GALLINE OVAIOLE IN ITALIA
Tucciarone C.M., Pasotto D., Baston R., Andolfatto C., Poletto F., Harper V., Fiorini L., Franzo G., Legnardi M., Cecchinato M. pag. 174

- CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEGLI AGENTI VIRALI IMMUNODEPRESSIVI E DELLE LESIONI ASSOCIATE RILEVATE MEDIANTE MONITORAGGIO LONGITUDINALE IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE
Zambon I., Zanardello C., Giacomelli M., Foiani G., Dall'Angelo A., Broggi M., Galbusera F., Pirotta M., Drago A., Leardini S., Perina A., Benini V., Varelli M.P., Fusaro A., Bortolami A. pag. 177
- PROCESSO LINFOPROLIFERATIVO A LOCALIZZAZIONE OCULARE IN UN GALLO ORNAMENTALE: È SEMPRE MALATTIA DI MAREK? CASO CLINICO CON REPERTI NECROSCOPICI, ISTOPATOLOGICI E IMMUNOISTOCHEMICI
Zanardello C., Giacomelli M., Perina A., Bortolami A., Fiorentini L., Perulli S., Catania S. pag. 184
- CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI CLINICI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI DA POLLI DI ALLEVAMENTI COMMERCIALI
Giovanardi D., Zandonà L., Moschioni C., Tonon E., Bacchin C., Rizzardi A., Luisetto P., Cesca A., Drigo I., Bano L. pag. 192



PREMIO CORRADO LONGONI VINCITORE

- EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV) IN ITALIA: EMERGENZA DI CEPPI RIASSORTANTI EUROPEI NORD-OCIDENTALI (GENOTIPO A3B1) E DINAMICHE DI CO-CIRCOLAZIONE CON CEPPI AUTOCTONI
Poletto F., Lizzi G., Legnardi M., Lupini C., Tucciarone C.M., Franzo G., Giaccone V., Pedrazzoli S., Quaglia G., Graziosi G., De Nardi M., Catelli E., Cecchinato M. ... pag. 198
- INDICE DEGLI AUTORI..... **pag. 210**



IL LENTA CRESCITA



Leader di settore per la
resa in carne



Accreditato
ECC



Eccellente
benessere
animale



Lenta Crescita
Autorizzato dal
Ministero della
Sovranità Alimentare



Eccezionale
efficienza
alimentare



BREEDING
SUCCESS
TOGETHER


Aviagen[®]





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

INNOVAZIONE

PROTEZIONE

VALORE
AGGIUNTO



Combatti la *Salmonella* con Primun

Primun *Salmonella* E / Primun *Salmonella* T

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

Primun *Salmonella* E



Foglio illustrativo

Primun *Salmonella* T



Foglio illustrativo

C CALIER

*Secondo SPC

**Impiego in deposizione nei paesi autorizzati



Primun *Salmonella* E

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

Primun *Salmonella* T

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



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

**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



BIOLIVE®

healthy & natural products

FitoMITE® Feed

- AZIONE CONTRO IL
Dermanyssus Gallinae
- SENZA EFFETTI
INDESIDERATI
- FACILE
SOMMINISTRAZIONE

Naturalmente
EFFICACE



 **chemifarma®**



FAMIQS

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



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

Elanco

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

AviPro, 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 2026
sono realizzate grazie al contributo di:



PREFAZIONE

Legnaro (PD), 18 giugno 2026

È con particolare soddisfazione che presento gli Atti del 65° Convegno Annuale della Società Italiana di Patologia Aviaria, svoltosi a Verona il 15 maggio 2026, dedicato al tema “Dall’incubatoio al territorio: innovazione e gestione nel controllo delle patologie in ambito avicolo” e dell’11° Simposio Scientifico, che si svolgerà a Ozzano dell’Emilia (BO).

Il grande successo dell’evento di Verona, testimoniato dalla numerosa partecipazione dei soci e degli operatori del settore, rappresenta un segnale estremamente positivo per la nostra Società. Una presenza così ampia e partecipe non si registrava da tempo e conferma il forte interesse verso le attività scientifiche della SIPA e il ruolo centrale che la nostra Società continua a svolgere quale luogo di incontro e confronto tra ricerca, diagnostica e professione.

Il programma scientifico ha affrontato temi di grande attualità per il comparto avicolo. La giornata si è aperta con l’intervento del Dott. Tolga Erkus, che ha illustrato un approccio sistematico alla risoluzione delle problematiche dell’incubatoio, richiamando l’attenzione sull’importanza di avviare ogni ciclo produttivo con un pulcino sano. Il ruolo dell’incubatoio rappresenta infatti il primo fondamentale presidio sanitario della filiera e costituisce la base per garantire benessere animale, sostenibilità produttiva e riduzione del rischio di malattia.

Particolare attenzione è stata poi dedicata alla laringotracheite infettiva aviaria, tema affrontato dal Dott. Alessio Bortolami, che ha presentato gli aggiornamenti relativi alla malattia e all’epidemiologia dei ceppi circolanti in Italia. A seguire, il dott. Luigi Gavazzi e il dott. Salvatore Catania hanno illustrato l’esperienza del Gruppo Tecnico ILT, evidenziando come la gestione coordinata delle patologie di territorio rappresenti uno strumento essenziale per il controllo efficace delle malattie infettive nel settore avicolo.

Di grande interesse è stato inoltre l’aggiornamento dedicato all’influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI). Il Dott. Calogero Terregino ha fornito una panoramica sulla situazione epidemiologica attuale e ha illustrato ai partecipanti un quadro chiaro delle strategie che il nostro Paese sta adottando per affrontare una delle più importanti sfide sanitarie del comparto avicolo degli ultimi anni.

La sessione conclusiva, presentata dalla Dott.ssa Laura Fiorentini, è stata dedicata al tema dell’appropriatezza diagnostica in patologia aviaria e all’integrazione dei Percorsi Diagnostici Appropriati (PDA) nella rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. L’argomento ha evidenziato come l’evoluzione delle conoscenze e

delle tecniche diagnostiche richieda percorsi sempre più condivisi, armonizzati ed efficienti, a supporto della sanità animale e della competitività del settore.

Questo convegno rappresenta inoltre un importante momento di avvicinamento al Simposio Scientifico SIPA, che si terrà prossimamente a Ozzano dell'Emilia (BO), sede universitaria storicamente legata allo sviluppo della patologia aviaria italiana. L'evento vedrà la partecipazione di numerosi gruppi di ricerca nazionali con oltre venti contributi scientifici e offrirà un'importante occasione di confronto sulle più recenti acquisizioni della ricerca nel settore. L'elevato numero di relazioni presentate e la varietà dei temi affrontati testimoniano la vitalità della nostra Società e la qualità scientifica delle realtà di ricerca che operano sul territorio nazionale.

La SIPA continua dunque a rappresentare un punto di riferimento per il dialogo tra ricerca, diagnostica e pratica professionale. La vitalità dei gruppi di ricerca presenti sul territorio, la partecipazione crescente dei soci e la capacità di affrontare temi di interesse strategico per la filiera avicola costituiscono elementi di grande fiducia per il futuro della nostra Società.

Desidero ringraziare tutti i relatori, gli organizzatori, gli sponsor e i partecipanti che hanno contribuito al successo degli eventi. Un ringraziamento particolare va ai soci SIPA, il cui entusiasmo e coinvolgimento rappresentano la risorsa più preziosa per la crescita della nostra comunità scientifica.



Prof. Mattia Cecchinato

Presidente SIPA - Società Italiana di Patologia Aviaria

ATTI DEL 65° CONVEGNO NAZIONALE SIPA

CONVEGNO

**Dall'incubatoio al territorio:
innovazione e gestione nel controllo
delle patologie in ambito avicolo**

Verona (VR), 15 Maggio 2026

HATCHERY PROBLEM-SOLVING FRAMEWORK

Tolga Erkus



LARINGOTRACHEITE INFETTIVA AVIARE IN ITALIA: AGGIORNAMENTI SU DIAGNOSI, MONITORAGGIO DELLA VACCINAZIONE ED EPIDEMIOLOGIA DEI CEPPI RECENTI

Alessio Bortolami



Apri presentazione ↗

OLTRE L'EMERGENZA: IL MODELLO DEL GRUPPO TECNICO ILT NELLA GESTIONE DELLE PATOLOGIE DI TERRITORIO

Luigi Gavazzi e Salvatore Catania



Apri presentazione ↗

La gestione della Laringotracheite Infettiva (ILT) nell'avicoltura nazionale impone oggi un profondo cambio di prospettiva, segnando il passaggio definitivo da una logica di intervento puramente emergenziale a una visione strategica e lungimirante di controllo del territorio. L'analisi accurata dei focolai e dei dati epidemiologici accumulati negli ultimi anni conduce a una prima conclusione: la malattia, sia nelle sue espressioni cliniche che dal punto di vista della sensibilità e dell'efficacia degli strumenti diagnostici operativi nei laboratori, è rimasta sostanzialmente immutata nel tempo. La persistenza del virus e la sua distribuzione geografica non sono quindi imputabili a variazioni antigeniche dell'agente eziologico o a sistemi tecnici di rilevamento inadeguati, bensì possono essere correlate in modo diretto ai nostri comportamenti e alle condotte gestionali ed umane, che non sempre si sono dimostrate all'altezza della sfida biologica ed epidemiologica attuale nelle condizioni di densità avicola nelle zone interessate. Nonostante la sintomatologia acuta tipica – caratterizzata da rantoli, forte abbattimento, scolo nasale e dalle caratteristiche lesioni necrotico-emorragiche a livello di laringe e trachea – e le misure manageriali di contenimento siano ampiamente conosciute dalla comunità scientifica e veterinaria, la reale differenza nell'arrestare il contagio risiede nella costanza e nella capillarità con cui vengono applicate le procedure. Elementi cruciali quali la gestione della pollina (da trattare termicamente in capannone chiuso a 38°C per 48 ore), il rispetto rigoroso del vuoto sanitario fino a 21 giorni, il carico controllato al macello, l'utilizzo di personale aziendale protetto rispetto a ditte esterne non verificate e il monitoraggio stringente di vettori indiretti come i camion da trasporto rappresentano la reale barriera contro la diffusione virale. Quando queste misure vengono applicate solo parzialmente o in modo atomizzato, il virus trova inevitabilmente spazio per circolare. Per tale motivo, si rende assolutamente necessaria una radicale revisione dell'approccio strategico attraverso una maggiore e concreta aggregazione tra tutti i differenti attori del comparto: le aziende produttrici, i veterinari aziendali, le Unità Sanitarie Locali (USL), i laboratori diagnostici e il mondo scientifico universitario e degli Istituti Zooprofilattici. Questo fronte comune deve poggiare su una base dati epidemiologica comune e armonizzata, uno strumento indispensabile per superare le asimmetrie informative, garantire la massima trasparenza e agire tempestivamente alla comparsa dei primi segnali epidemiologici. Questa transizione verso una cooperazione estesa trova una sua perfetta evoluzione concettuale in una visione del tessuto avicolo produttivo allargata, dove l'attenzione si sposta sul territorio inteso non più come una sommatoria di singole aziende separate, bensì come un vero e proprio "Macrorganismo". Si tratta di un principio cardine fortemente richiamato anche dall'Animal Health Law europeo, il quale sancisce che una gestione ottimale della sanità animale può essere conseguita soltanto attraverso la cooperazione inclusiva, chiara e trasparente tra i detentori di animali, gli operatori e i veterinari. In questo contesto sistemico si esprime al meglio la parte di inte-

grazione del Gruppo Tecnico specialistico, la cui operatività potrebbe essere formalizzata e istituzionalizzata come parte integrante della nostra Società Scientifica. Pratiche logistiche, flussi di trasporto, tempistiche dei vuoti sanitari a livello di comprensorio e la gestione del ricircolo di materiali o della pollina tra strutture diverse sono dinamiche che, se lasciate prive di una regia tecnica complessiva, possono favorire in modo determinante la diffusione virale a livello inter-aziendale. Compito del Gruppo Tecnico diventa quindi quello di mappare e valutare questi fattori di rischio, coinvolgendo capillarmente ogni portatore d'interesse della filiera avicola per eliminare le zone d'ombra ed eventualmente stilare documenti tecnici di indirizzo per la prevenzione e la gestione rapida delle crisi epidemiche. Come ammonisce l'esperienza sul campo, dopo un'epidemia ne arriva inevitabilmente sempre un'altra se non si sanano le falle strutturali e comportamentali del sistema; la risposta strategica risiede perciò nella capacità di fare sistema all'interno del Macrorganismo territoriale, ricordando che se si vuole andare veloci si può correre da soli, ma se si vuole andare lontano è indispensabile camminare insieme.

AGGIORNAMENTI SULLA VACCINAZIONE PER HPAI IN ITALIA

Calogero Terregino



APPROPRIATEZZA DIAGNOSTICA IN PATOLOGIA AVIARE: L'INTEGRAZIONE DEI PERCORSI DIAGNOSTICI APPROPRIATI (PDA) NELLA RETE IIZZSS

Fiorentini L.¹, Antoci F.³, Averaimo D.¹⁰, Beverelli M.⁴, Bortolami A.², Bruni G.⁵, Compri E.², Cordioli B.¹, D'Annunzio G.¹, Desio G.⁷, Ferrara M. C.³, Galante D.⁴, Giacomelli M.², Gibelli L.R.¹, Mandola M.L.⁶, Marino A.M.F.³, Moreno Martin A.¹, Nogarol C.⁶, Paniccià M.⁹, Piersanti F.⁹, Pinna L.⁸, Puggioni G.⁸, Perulli S.¹, Rossi F.⁶, Salvaggio A.³, Tonon S.⁵, Trogu T.¹, Zanardello C.², Catania S.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata

⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana

⁶ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

⁷ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

⁸ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

⁹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

¹⁰ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise



Apri presentazione ↗

Summary

A coordinated multi-institutional framework involving ten Italian Experimental Zooprophyllactic Institutes was established to develop and harmonize Appropriate Diagnostic Pathways (ADPs) for poultry diseases, with particular focus on respiratory syndromes in chickens and turkeys. The methodology was based on a structured, consensus-driven approach integrating diagnostic workflow mapping, analytical test harmonization, and standardized data codification to ensure interoperability across laboratories. ADPs were designed to combine clinical, epidemiological, and anamnestic variables, enabling etiological stratification across viral, bacterial, mycotic, and parasitic agents. A two-tier diagnostic priority system was implemented to distinguish mandatory from conditional investigations, optimizing resource allocation according to pre-test probability and epidemiological risk. Risk stratification was further refined through the incorporation of mortality thresholds, seasonal patterns, and completeness of anamnestic data. Species-specific ADPs were developed to account for differences in host susceptibility, sampling matrices, and diagnostic sensitivity. The resulting protocols define adaptive testing panels under low- and high-risk scenarios, ensuring both broad-spectrum surveillance and targeted detection of high-impact pathogens, including those of relevance for transboundary diseases. From a public health perspective, the implementation of harmonized ADPs supports improved management of zoonotic and economically relevant pathogens, reinforcing biosecurity measures and aligning with the One Health

approach. This model provides a scalable and transferable strategy for integrating diagnostic standardization, epidemiological intelligence, and veterinary public health objectives.

INTRODUZIONE

A partire dagli anni '90, i progressi della medicina di laboratorio hanno trasformato profondamente la diagnostica in Sanità Animale, rendendo i laboratori della rete IIZZSS attori chiave sia in ambito clinico sia epidemiologico. Questo cambiamento è stato guidato dall'evoluzione dello scenario sanitario: comparsa di nuove patologie, riduzione di quelle tradizionali, maggiore complessità dei quadri clinici, necessità di gestire emergenze epidemiche in contesti ad alta densità di allevamenti e sotto normative sempre più stringenti, oltre a una crescente richiesta di prestazioni. Se in passato tali sviluppi sono stati sostenuti da consistenti investimenti, oggi la disponibilità di risorse risulta limitata rispetto ai bisogni. Ne deriva la necessità di adottare anche in ambito veterinario il principio dell'appropriatezza diagnostica, intesa come uso efficace, mirato e sostenibile delle indagini, evitando richieste eccessive o poco utili, che possono aumentare i costi senza migliorare l'esito diagnostico. In questo contesto, la *Evidence Based Practice* rappresenta un riferimento fondamentale: le decisioni diagnostiche devono basarsi sull'integrazione tra esperienza professionale e migliori evidenze scientifiche, senza sostituire ma valorizzando il ruolo del medico veterinario. Un supporto operativo è fornito da protocolli, linee guida e procedure standardizzate, strumenti utili per ridurre la variabilità decisionale, ottimizzare le risorse e migliorare la qualità degli interventi, anche in relazione alla gestione sanitaria degli allevamenti e all'uso responsabile degli antibiotici. Diventa quindi strategico sviluppare Percorsi Diagnostici Appropriati (PDA), costruiti attraverso il confronto tra diverse professionalità e finalizzati a rendere più efficiente e armonico il sistema diagnostico. Tali percorsi permettono di adeguare la rete degli IIZZSS alle nuove esigenze legate alle malattie infettive, in coerenza con il quadro normativo vigente. In questo contesto, l'intento è quello di promuovere una maggiore uniformità operativa tra le diverse realtà territoriali, riducendo le possibili disomogeneità nei differenti approcci diagnostici. Parallelamente, si mira a rafforzare la capacità di individuazione precoce delle malattie attraverso l'adozione di percorsi sindromici strutturati, in grado di orientare sistematicamente il processo diagnostico. Questo approccio permette, inoltre, di valorizzare i dati di negatività verso agenti ritenuti rilevanti per la specifica sindrome, contribuendo così in modo efficace alle attività di sorveglianza passiva. Un ulteriore elemento centrale riguarda la valorizzazione del dato diagnostico, attraverso processi di digitalizzazione che ne consentano la disponibilità in tempo reale su piattaforme dedicate. Ciò favorisce una più efficace integrazione tra il veterinario aziendale e il sistema dei laboratori ufficiali, contribuendo a rendere più efficiente e coordinata l'intera filiera diagnostica. L'attività descritta è stata avviata nell'ambito di un Progetto di Ricerca Strategica Ministeriale. Il progetto ha costituito il quadro operativo e metodologico che ha reso possibile lo sviluppo delle attività progettuali, quali:

- la definizione del quadro tecnico di riferimento, tramite l'identificazione delle principali malattie divise per specie secondo la normativa UE e organizzando gruppi di lavoro con struttura coordinata;
- l'armonizzazione dei metodi diagnostici e della terminologia, introducendo un linguaggio condiviso e criteri uniformi di selezione dei test diagnostici;
- sviluppo di Percorsi Diagnostici Appropriati (PDA);
- digitalizzazione dei dati diagnostici mediante dashboard per il monitoraggio della corretta applicazione dei protocolli definiti, dei flussi informativi con possibile integrazione in piattaforme nazionali;
- validazione operativa dei PDA sul campo, attraverso la loro applicazione in condizioni reali di allevamento per valutarne efficacia, applicabilità e sostenibilità diagnostica.

MATERIALI E METODI

La gestione del network progettuale, che ha coinvolto 10 Istituti Zooprofilattici, è stata assicurata attraverso un sistema strutturato di coordinamento e comunicazione a distanza. Il coordinamento è stato garantito da un flusso continuo di aggiornamenti tra i responsabili dei gruppi e il coordinatore del progetto. La definizione dei Percorsi Diagnostici Appropriati (PDA) è stata organizzata secondo una sequenza operativa strutturata, articolata in più sottogruppi di lavoro con competenze specifiche. Un primo sottogruppo, dedicato agli aspetti macroscopici e microscopici del processo diagnostico, ha definito il flusso decisionale, dall'accettazione del campione e raccolta dell'anamnesi fino alla formulazione dei diversi sospetti diagnostici. L'analisi ha considerato l'insieme dei possibili agenti eziologici (virali, batterici, micotici e parassitari). In questa fase sono stati formalizzati elementi chiave del percorso, tra cui il concetto di "matrice minima" (carcassa intera per i volatili) e l'importanza dell'anamnesi come requisito obbligatorio. Un secondo sottogruppo, dedicato alle metodiche analitiche e al thesaurus, ha lavorato all'armonizzazione dei test diagnostici per la ricerca dei patogeni, privilegiando la specificità delle metodiche disponibili, indipendentemente dal loro stato di validazione o accreditamento. Parallelamente, è stata costruita una codifica standardizzata per la trasmissione dei dati e definita una modalità univoca di espressione dei risultati, funzionale all'integrazione nei sistemi informativi. I dati strutturati secondo i PDA sono stati convertiti in formati tabellari e successivamente armonizzati per lo sviluppo di dashboard operative, utili al monitoraggio delle attività riguardanti le diverse sezioni diagnostiche. L'attività dei gruppi tecnici ha consentito la definizione di cinque nuovi Percorsi Diagnostici Appropriati (PDA). Tra questi rientrano i PDA dedicati alla sindrome respiratoria del pollo e del tacchino. La separazione del comparto avicolo in due distinti percorsi è stata introdotta per rispondere alle differenze tra le specie in termini di matrice campionaria e requisiti di sensibilità diagnostica. I due percorsi diagnostici definiscono in maniera strutturata i criteri di valutazione e gli approcci diagnostici impiegati per la gestione delle principali sindromi respiratorie nei polli e nei tacchini, con l'obiettivo di standardizzare l'inquadramento clinico-diagnostico e garantire l'omogeneità nell'interpretazione dei casi in relazione al contesto epidemiologico. Le condizioni cliniche sono classificate in due principali entità sindromiche: la sindrome respiratoria del pollo e la sindrome respiratoria del tacchino. Ciascuna di esse comprende un insieme eterogeneo di quadri clinici riconducibili a differenti agenti eziologici di natura virale, batterica, micotica e parassitaria. La definizione del sospetto eziologico viene effettuata mediante integrazione tra dati clinici, epidemiologici e anamnestici, con particolare attenzione alla dinamica di diffusione intra-gruppo e al livello di mortalità osservato.

Sistema di priorità diagnostica

All'interno delle procedure diagnostiche viene adottato un sistema di classificazione dell'obbligatorietà degli accertamenti articolato su due livelli di priorità, indicati convenzionalmente mediante asterischi. L'asterisco singolo (*) identifica gli agenti eziologici o le indagini diagnostiche da considerarsi sempre obbligatori nell'iter standard, indipendentemente dal quadro clinico iniziale. Il doppio asterisco (**) segnala invece gli agenti o gli accertamenti da includere obbligatoriamente solo in presenza di specifici elementi clinici, epidemiologici o anamnestici che ne giustificano il sospetto. In assenza di asterischi, le indagini sono da ritenersi facoltative. Questo sistema consente di modulare il pannello diagnostico in base al rischio e alla probabilità pre-test, ottimizzando l'impiego delle risorse e migliorando l'appropriatezza dell'indagine eziologica.

Criteri epidemiologici di stratificazione del rischio

I PDA relativi alla sindrome respiratoria nel pollo e nel tacchino identificano due principali scenari epidemiologici:

- uno scenario a bassa mortalità, corrispondente a un periodo non a rischio (aprile–agosto), caratterizzato da una minore pressione infettiva e da una ridotta circolazione di specifici agenti virali ad andamento stagionale;
- uno scenario ad elevata mortalità e/o associato ad un periodo a rischio (settembre–marzo) e/o ad un'anamnesi incompleta o assente, correlato ad una maggiore probabilità di diffusione rapida di patogeni ad alta contagiosità e rilevante impatto clinico.

Il periodo stagionale viene utilizzato come proxy epidemiologico della probabilità di circolazione virale e della pressione infettiva ambientale.

Anamnesi minima

La raccolta dell'anamnesi minima rappresenta un elemento cardine del processo diagnostico, in quanto consente la contestualizzazione epidemiologica del caso e l'interpretazione corretta del quadro clinico. Essa comprende:

- la registrazione del periodo di riferimento, coincidente con la data di conferimento del campione;
- la valutazione della mortalità in relazione alla dimensione del gruppo.

La mortalità viene interpretata secondo soglie differenziate:

- nei gruppi inferiori a 500 capi, è considerata significativa quando $\geq 10\%$;
- nei gruppi superiori a 500 capi si utilizza il tasso di mortalità giornaliero (TMG), ritenuto significativo quando $\geq 0,2\%$.

Ulteriori elementi anamnestici fondamentali includono:

- il luogo di provenienza degli animali;
- la descrizione dell'evento clinico;
- il numero di soggetti colpiti rispetto alla consistenza totale del gruppo;
- la data di insorgenza dei sintomi;
- la velocità di diffusione del quadro patologico;
- la descrizione dettagliata dei principali segni clinici osservati

RISULTATI

Sindrome respiratoria del pollo

La sindrome respiratoria del pollo rappresenta un complesso sindromico multifattoriale caratterizzato dalla presenza di segni clinici respiratori di varia intensità (starnuti, rantoli, dispnea, scolo nasale, congiuntivite), riconducibili a eziologie virali, batteriche, parassitarie o micotiche. L'inquadramento eziologico viene definito mediante un algoritmo decisionale che integra tre variabili principali: mortalità osservata, stagionalità epidemiologica e completezza anamnestica.

Pannello eziologico, scenario a bassa mortalità e periodo non a rischio (aprile–agosto)

In condizioni di bassa mortalità e periodo non a rischio, il pannello diagnostico viene mantenuto ampio e include le seguenti categorie eziologiche:

Eziologia virale

- Influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) **
- Malattia di Newcastle **
- Laringotracheite infettiva
- Metapneumovirus aviare
- Bronchite infettiva

Eziologia batterica

- Colera aviare (*Pasteurella multocida*) *
- *Escherichia coli* *

- *Ornithobacterium rhinotracheale* *
- *Riemerella anatipestifer* *
- Corizza infettiva (*Avibacterium paragallinarum*) *
- *Mycoplasma gallisepticum* **
- *Mycoplasma synoviae*
- *Chlamydia* spp.

Altra eziologia

- Parassitaria: *Syngamus trachea*
- Micotica: *Aspergillus* spp.

Pannello eziologico, scenario ad alta mortalità o rischio aumentato

In presenza di alta mortalità, periodo epidemiologico a rischio (settembre–marzo) e/o insufficienza anamnestica, il pannello viene razionalizzato e focalizzato sugli agenti a maggiore impatto epidemiologico e clinico:

Eziologia virale

- Influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) *
- Malattia di Newcastle **
- Laringotracheite infettiva

Eziologia batterica (vedi Pannello eziologico, scenario a bassa mortalità e periodo non a rischio)

Sindrome respiratoria del tacchino

Analogamente alla specie pollo, la sindrome respiratoria del tacchino è caratterizzata da un complesso quadro clinico respiratorio multifattoriale, la cui espressione varia in funzione della pressione infettiva, della stagionalità e delle condizioni gestionali.

Pannello eziologico, scenario a bassa mortalità e periodo non a rischio (aprile–agosto)

Eziologia virale

- Influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) **
- Malattia di Newcastle **
- Metapneumovirus aviare

Eziologia batterica

- Colera aviare (*Pasteurella multocida*) *
- *Escherichia coli* *
- *Ornithobacterium rhinotracheale* *
- *Riemerella anatipestifer* *
- *Mycoplasma gallisepticum* **
- *Mycoplasma synoviae*
- *Chlamydia* spp.

Eziologia micotica

- *Aspergillus* spp.

Pannello eziologico, scenario ad alta mortalità o rischio aumentato

Eziologia virale

- Influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) *
- Malattia di Newcastle **

Eziologia batterica (vedi Pannello eziologico, scenario a bassa mortalità e periodo non a rischio)

CONCLUSIONI

I protocolli consentiranno l'adozione di un approccio diagnostico strutturato, gerarchico e adattativo, modulato in funzione del rischio epidemiologico, della mortalità osservata e della

qualità delle informazioni anamnestiche disponibili. Tale impostazione garantisce una valutazione sistematica, armonica, riproducibile e coerente delle principali eziologie respiratorie aviarie. In questo modo si migliora l'accuratezza della diagnosi supportando in modo più efficace le decisioni sanitarie veterinarie su tutto il territorio nazionale, offrendo un servizio diagnostico aggiornato e adeguato all'evoluzione delle condizioni epidemiologiche. Un'impostazione di questo tipo, centrata principalmente sulla tutela della salute pubblica e sulla piena tracciabilità e trasparenza delle informazioni, consente di rafforzare la gestione veterinaria dei territori a forte vocazione zootecnica, secondo i dettami del Regolamento (UE) 2016/429. Ne deriva un sistema di controllo più preciso, puntuale ed efficace nelle diverse realtà territoriali nazionali, in grado di assicurare un adeguato supporto diagnostico sia alla produzione che all'Autorità Competente e nel contempo garantire sia la sicurezza delle produzioni alimentari sia la continuità degli scambi commerciali internazionali, secondo una visione integrata riconducibile al paradigma One Health.

BIBLIOGRAFIA

1. Brook RH, Chassin MR, Fink A, Solomon DH, Kosecoff J, Park RE. A method for the detailed assessment of the appropriateness of medical technologies. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*. 1986;2(1):53–63. doi:10.1017/S0266462300002774.
2. Brook RH. Appropriateness: the next frontier. *BMJ*. 1994;308(6923):218–219. doi:10.1136/bmj.308.6923.218.
3. Bollig N, Clarke L, Elsmo E, Craven M. Machine learning for syndromic surveillance using veterinary necropsy reports. *PLoS One*. 2020;15(2):e0228105. doi:10.1371/journal.pone.0228105.
4. Faverjon C, Küker S, Furrer L, Berezowski J, Posthaus H, Rinaldi F, Vial F. Retrospective analysis of 11 years of livestock necropsy data: evaluation for animal health surveillance. 2017:228–230. Available from: <http://www.sciquest.org.nz/node/139885>.
5. Dórea FC, Vial F. Animal health syndromic surveillance: a systematic literature review of the progress in the last 5 years (2011–2016). *Veterinary Medicine (Auckland)*. 2016;7:157–170. doi:10.2147/VMRR.S90182.
6. Orakpoghenor O, Terfa AJ. Necropsy as an important diagnostic step in veterinary pathology: the past, present, and future perspectives. *Research in Veterinary Science and Medicine*. 2024;4:1. doi:10.25259/RVSM_6_2024.
7. Yaeger MJ, Van Alstine WG. Respiratory system. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine*. 11th ed. Ames (IA): Wiley-Blackwell; 2019. p. 393–407.
8. Chretien JP, Burkom HS, Sedyaningsih ER, et al. Syndromic surveillance: adapting innovations to developing settings. *PLoS Medicine*. 2008;5(3):e72. doi:10.1371/journal.pmed.0050072.
9. Zühlke S, Bodmer M, Münger A, Steiner A, Schüpbach-Regula G. Factors associated with cattle necropsy submissions in Switzerland. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2021;33(4):711–719.

ATTI DEL 11° SIMPOSIO SCIENTIFICO

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Ozzano dell'Emilia (BO), 10-11 Settembre 2026

COMPARAZIONE DELLA CINETICA DI DIVERSI VACCINI 793B (GI-13) CONTRO IL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV) SOMMINISTRATI AD UN GIORNO DI VITA IN COMBINAZIONE CON UN VACCINO MASS (GI-1)

Andolfatto C.¹, Sartore P.², Pezzotti R.³, Legnardi M.¹, Poletto F.¹, Baston R.¹, Tucciarone C.M.¹, Franzo G.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;*

³ *Vaxxinova Italy, Via San Zeno 99/A, 25124 Brescia, Italia*

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is one of the main pathogens affecting the poultry industry. Although it remains a daily challenge that causes clinical and economic problems in the poultry sector, the spread of the virus in Europe has decreased over the years thanks to vaccination, which remains the primary tool to control the virus in the field. The high antigenic variability of IBV makes it necessary to use combinations of vaccines based on different strains, whose compatibility and efficacy require careful evaluation.

The purpose of this study was to evaluate the kinetics of a Mass vaccine (GI-1) combined with three different 793B vaccines (GI-13), which is one of the most common combinations used. The study involved 60 broilers, divided into 3 groups (A, B, C) of 20 birds each, raised in separate rooms. Vaccination was administered on the first day of life by ocular route. Group A was vaccinated with Mass and V-173/11 strains, Group B with Mass and 1/96 strains, and Group C with Mass and 4/91 strains. Sampling was done at 8 different moments between day 1 and day 22, collecting 20 oropharyngeal swabs and 20 cloacal swabs at each time. For each group, matrix and sampling time, the samples were divided into 2 pools and analyzed with molecular tests using real-time RT-PCR assays specific for the different vaccine strains. On day 22, blood was also collected from each animal, for a total of 60 sera, which were then tested with hemagglutination inhibition (HI) tests specific for Mass, 4/91, and QX.

Molecular analyses showed an early, long-lasting replication with high titres of both Mass and 793B strains in all 3 groups. The only exception was the absence of Mass replication in the cloaca, which proves that this strain mostly targets the respiratory system. In general, the results from the different groups were comparable, although group A showed kinetics with slightly more constant and higher titres.

The serology results confirmed that all vaccination protocols elicited a good seroconversion. The results were slightly lower in group B, partly because the 1/96 strain reacted less with the 4/91 antigen used in the HI test. Specific antibodies for QX were found in all 3 groups, confirming that heterologous protocols combining Mass and 793B are effective against this lineage.

Based on these results, it is important to continuously study the kinetics of vaccine viruses used in the field, especially the combinations normally chosen in daily field routine. The study also shows full compatibility between the different 793B vaccines tested and Mass strains when they are given together at one day of age.

INTRODUZIONE

L'industria avicola rappresenta, al giorno d'oggi, uno dei settori zootecnici maggiormente produttivi a livello mondiale, nonostante la continua minaccia posta dalle malattie a carattere

infettivo, numerose delle quali presentano un'eziologia virale. Tra di esse, la bronchite infettiva (IB) rappresenta una delle maggiori cause di perdita economica per l'avicoltura globale. Essa è causata dal virus della bronchite infettiva (IBV), appartenente al genere *Gammacoronavirus*, la cui infezione è tipicamente associata ad una lieve o moderata sintomatologia respiratoria, scompensi riproduttivi, calo della produzione di uova e una possibile forma a carico dei reni causata da alcuni ceppi, tra i quali quelli appartenenti al *lineage* QX (GI-19), che attualmente rappresenta il principale *lineage* di campo circolante in Italia (1). La quasi totalità del comparto avicolo adotta quindi intensi protocolli di vaccinazione nei confronti di IBV nel tentativo di prevenire la patologia, ricorrendo principalmente all'utilizzo di vaccini vivi attenuati e consecutivamente la somministrazione di vaccini inattivati per il *boosting* immunitario nel caso di ovaiole e riproduttori (2).

Essendo un virus a RNA, IBV è caratterizzato da un tasso di mutazione elevato, che, insieme ad una elevata propensione alla ricombinazione, causa l'emergere di nuove varianti genetiche, spesso caratterizzate da differenze in termini di patogenicità, tropismo tissutale, cross-protezione e distribuzione geografica (3). Questa variabilità ha profonde ripercussioni in termini di controllo, richiedendo una pianificazione accurata del protocollo vaccinale. Le due strategie dominanti prevedono una vaccinazione omologa, in cui gli animali vengono immunizzati con un ceppo vaccinale il più possibile simile al ceppo di campo circolante, o eterologa, che combina ceppi vaccinali antigenicamente distinti per ottenere uno spettro di protezione più ampio (4-10). Sebbene quest'ultimo approccio, basato sul concetto di prototipo, risulti più standardizzato, la sua efficacia richiede che i vaccini utilizzati, specie se somministrati in contemporanea, risultino pienamente compatibili, non diminuendo la replicazione dei singoli ceppi vaccinali e la conseguente immunizzazione.

Per questo motivo, il presente studio era finalizzato ad analizzare, attraverso un'indagine longitudinale svolta mediante tecniche molecolari e sierologiche, la cinetica di differenti vaccini basati su ceppi 793B (GI-13) contro IBV, quando co-somministrati con un vaccino Massachusetts (GI-1) a un giorno di vita.

MATERIALI E METODI

Lo studio di cinetica vaccinale è stato condotto in condizioni di campo in un allevamento commerciale su 3 gruppi (A, B, C) composti da 20 broiler ciascuno. Il gruppo A è stato immunizzato coi ceppi Mass e V-173/11, il gruppo B coi ceppi Mass e 1/96, il gruppo C coi ceppi Mass e 4/91. Tutti i 4 vaccini sono stati ricostituiti in acqua distillata in erogatori distinti e somministrati agli animali tramite goccia oculare. Il quantitativo di acqua è stato calcolato sulla base del numero di dosi fornite dai singoli flaconi di vaccino.

Lo studio ha avuto una durata totale di 22 giorni in cui il campionamento è stato eseguito longitudinalmente ai giorni 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, e 22, prelevando 20 tamponi orofaringei e 20 tamponi cloacali per ciascun gruppo di animali. In aggiunta, al giorno 22 è stato effettuato un prelievo di sangue da ciascun animale, per un totale di 60 campioni di siero.

Ciascuna tipologia di campioni prelevati in un dato gruppo e momento di campionamento è stata quindi suddivisa in 2 *pool*, per un totale di 48 *pool* di tamponi orofaringei e altrettanti *pool* di tamponi cloacali. Dopo l'estrazione degli acidi nucleici, ciascun *pool* è stato analizzato con test di qRT-PCR specifici per il ceppo vaccinale Mass e per i differenti ceppi vaccinali 793B (GI-13). Il valore di *cycle threshold* (Ct) considerato per ciascun momento di campionamento è stato ricavato tramite media dei valori ottenuti processando i due *pool* della medesima tipologia di tamponi.

I campioni di siero sono stati testati presso l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (Legnaro, Italia) con test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) per la ricerca degli anticorpi contro i ceppi Mass, 793B e QX.

RISULTATI

I risultati delle analisi molecolari eseguite sono mostrati in Figura 1. Tutti i *pool* di tamponi orofaringei sono risultati positivi sia per il ceppo Mass che per il ceppo 793B somministrato nel rispettivo gruppo. Per quanto riguarda i *pool* di tamponi cloacali, sono state riscontrate 4 negatività a ceppi 793B (3 nel gruppo B, 1 nel gruppo C), mentre solo 3 di essi sono risultati positivi per Mass. Tutti i 3 ceppi appartenenti al genotipo 793B sono stati rilevati in modo comparabile nei rispettivi gruppi, raggiungendo il picco di replicazione entro il 6° giorno d'età e mostrando titoli più variabili a livello cloacale. Similmente, i titoli del vaccino Mass hanno mostrato una decrescita progressiva a livello respiratorio, rimanendo nulli nei tamponi cloacali ad eccezione di due ritrovamenti ad alti Ct al primo punto di campionamento nei gruppi A e C.

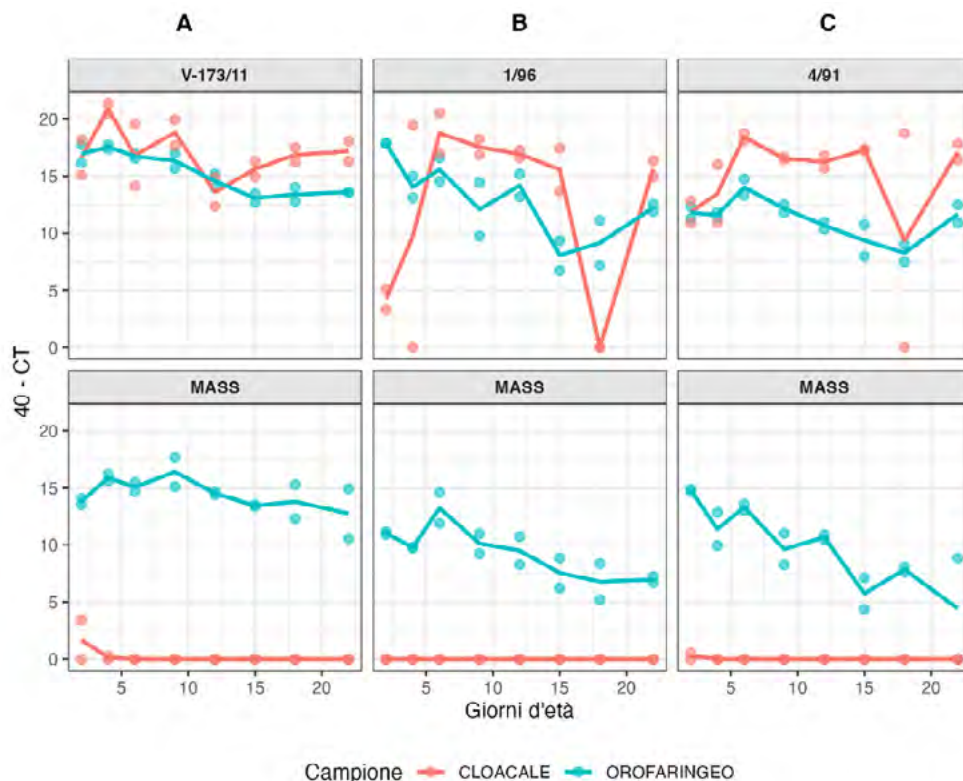


Figura 1. Cinetiche dei diversi ceppi vaccinali divisi per gruppo e tipologia di tamponi prelevata.

Per quanto riguarda i risultati della sierologia, i titoli HI nei confronti del ceppo Mass hanno mostrato nel gruppo A 20 positività (100%) con media geometrica (GMT) di 55,7; nel gruppo B 19 positività (95%) con GMT di 32,0; nel gruppo C 20 positività (100%) con GMT di 50,2. Nei confronti del ceppo 793B hanno mostrato nel gruppo A 20 positività (100%) con GMT di 21,8; nel gruppo B 13 positività (65%) con GMT di 13,9; nel gruppo C 16 positività (80%) con GMT di 24,2. Nei confronti del ceppo QX hanno mostrato nel gruppo A 19 positività (95%) con GMT di 25,1; nel gruppo B 16 positività (80%) con GMT di 21,8; nel gruppo C 18 positività (90%) con GMT di 30,9.

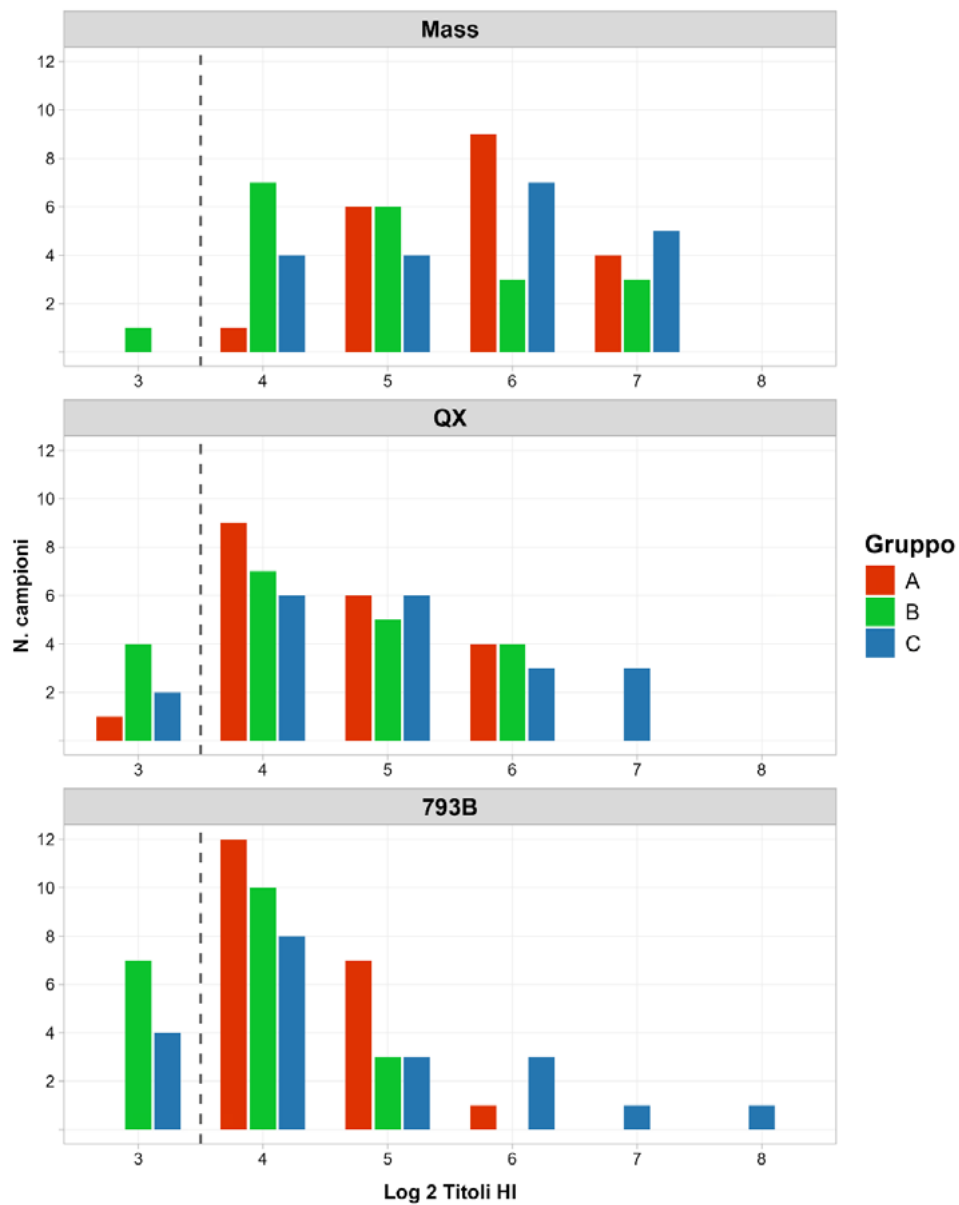


Figura 2. Risultati dei test di inibizione dell'emagglutinazione specifici per Mass, 793B e QX.

DISCUSSIONE

L'endemicità di IBV e la sua estrema variabilità genetica comportano sfide quotidiane in materia di strategie di controllo, che riguardano principalmente le proprietà immunologiche dei vaccini utilizzati e gli aspetti gestionali (11). Nel presente studio è stato indagato il primo di questi aspetti, studiando attraverso tecniche molecolari e sierologiche le dinamiche replicative e la risposta immunitaria prodotta da diverse combinazioni di vaccini vivi attenuati somministrate contemporaneamente al primo giorno di vita.

Le indagini di biologia molecolare hanno permesso di dimostrare un'intensa replicazione dei ceppi vaccinali 793B, supportata dalle numerose identificazioni ottenute processando sia i tamponi orofaringei che quelli cloacali. Le occasionali negatività osservate in questi ultimi si possono forse spiegare con un'escrezione intermittente. Il ceppo Mass ha invece esibito una tendenza differente, con positività costanti e ad alti titoli a livello orofaringeo ma assenti a livello cloacale: questo risultato conferma quanto rilevato da Cook et al. (12) in merito al tropismo prevalentemente respiratorio di Mass, supportando un'assenza di replicazione a livello di tonsille cecali. Le cinetiche osservate erano caratterizzate da un raggiungimento precoce del picco di replicazione, una progressiva decrescita dei titoli virali e, nel caso dei ceppi 793B, una parziale risalita in corrispondenza dell'ultimo punto di campionamento. Si tratta in generale di titoli pienamente soddisfacenti, anche se probabilmente favoriti dalla somministrazione per goccia oculare, la quale rappresenta una scelta ottimale per garantire una somministrazione individuale il più possibile standardizzata ma appare di difficile attuazione in condizioni di campo. Il ricorso alla somministrazione di massa tramite spray, più comunemente utilizzata in campo ma non attuata in questo studio per esigenze logistiche (principalmente legate alla bassa numerosità dei gruppi e alla necessità di impedire la cross-contaminazione tra diversi vaccini basati su 793B), sembra infatti determinare andamenti di replicazione differenti, con picchi più pronunciati e leggermente più tardivi, probabilmente motivati dalla somministrazione di minori quantità di virus vaccinale. Altre tendenze, come la maggiore capacità replicativa e persistenza dei ceppi 793B rispetto a Mass, appaiono invece confermate (11).

Sebbene le cinetiche osservate nei tre diversi gruppi siano risultate essenzialmente comparabili, il gruppo A, immunizzato con vaccini Mass e V-173/11, ha esibito trend di replicazione più costanti e caratterizzati da titoli mediamente più elevati per entrambi i ceppi somministrati. I risultati della sierologia confermano anch'essi l'efficacia dei tre protocolli testati, sebbene il gruppo B (Mass + 1/96) esibisca percentuali di positività e titoli anticorpali minori rispetto agli altri due gruppi. Va tuttavia considerato come, mentre i ceppi 4/91 e V-173/11 appaiono geneticamente affini, il virus vaccinale 1/96 è chiaramente distinguibile da essi, supportando una sua minore reattività nei confronti dell'antigene 4/91 usato nel test HI specifico per 793B. In generale, il rilievo più interessante è rappresentato dalle positività anticorpali nei confronti di QX, principale bersaglio dell'immunizzazione nel contesto italiano, che conferma la validità della combinazione eterologa tra ceppi Mass e 793B secondo il concetto di prototipo (13, 14).

CONCLUSIONI

Tutte e 3 le combinazioni vaccinali si sono dimostrate efficaci, a conferma della correttezza dei piani vaccinali eterologhi comunemente applicati e basati sulla combinazione dei *lineage* Mass e 793B. Di particolare interesse è la buona cross-protezione nei confronti di QX, *lineage* ad oggi prevalente in Italia. Il monitoraggio della cinetica vaccinale, attraverso biologia molecolare e sierologia, si conferma un buon strumento di valutazione della replicazione dei virus vaccinali, dovendo però considerare le importanti differenze tra le diverse sedi di escrezione, l'esatta combinazione di vaccini e la tecnica di somministrazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Franzo G, Legnardi M, Baston R, Poletto F, Andolfatto C, Tucciarone CM and M Cecchinato. (2025). Phylodynamic and phylogeographic reconstruction of IBV lineages: diverse paths and determinants, one goal for control. *Scientific Reports*, 15: 37068.
2. Jordan B. (2017). Vaccination against infectious bronchitis virus: A continuous challenge. *Veterinary Microbiology* 2017, 206: 137-143.
3. Legnardi M, Tucciarone CM, Franzo G and M Cecchinato. (2020). Infectious Bronchitis Virus Evolution, Diagnosis and Control. *Veterinary Sciences*, 7: 79.
4. Śmiałek M and J Kowalczyk. (2026). Evaluation of the Serological Baseline Values of Broiler Chickens Jointly Vaccinated with Infectious Bronchitis H + 120 and GI-13 Preparations Under Field Conditions. *Animals*, 16: 807.
5. Piśula A, Lisowska A, Opolska J, and K Domańska-Blicharz. (2026). Genetic Diversity of Infectious Bronchitis Virus Genotype II in Poland. *Pathogens*, 15: 44.
6. Bande F, Arshad SS, Bejo MH, Moeini H and AR Omar. (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *Journal of Immunology Research*, 1: 424860.
7. Cook JKA, Jackwood M and RC Jones. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology* 41: 239–250.
8. Jackwood MW. (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Diseases*, 56: 634–641.
9. Jackwood MW, Hall D and A Handel. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 12: 1305–1311.
10. de Wit JJ, Cook JKA and HM van der Heijden. (2011). Infectious bronchitis virus variants: A review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, 40: 223–235.
11. Tucciarone CM, Franzo G, Berto G, Drigo M, Ramon G, Koutoulis KC, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Evaluation of 793B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. *Poultry Science* 97: 303-312.
12. Cook JK, SJ Orbell, MA Woods, and MB Huggins. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology* 28:477–485.
13. Terregino C, Toffan A, Serena Beato M, De Nardi R, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M and I Capua. (2008). Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathology*, 37(5), 487-493.
14. Awad F, Hutton S, Forrester A, Baylis M and K Ganapathy. (2016). Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathology*, 45: 169-177.

BOTULISMO DEL POLLAME: EVIDENZE RACCOLTE IN OLTRE 15 ANNI DI ATTIVITÀ IN UN LABORATORIO DIAGNOSTICO VETERINARIO

Zandonà L., Drigo I., Gobbo E., Rizzardi A., Vedana M., Genovese S., Guolo A., Garbuio M., Viel L., Bano L.

Sezione di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba (TV), Italia

Summary

This study describes the trends in suspected and confirmed cases of avian botulism in farmed poultry diagnosed between 2009 and 2025 at the Diagnostic Laboratory of Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZS-Ve). The results demonstrate an increase in botulism cases in poultry, particularly in laying hens, meat turkeys, and broiler chickens. All cases were associated with the activity of neurotoxins produced by Group III *Clostridium botulinum*, with the mosaic C/D neurotoxin being the predominant toxin type identified.

Epidemiological investigations conducted on environmental samples identified risk factors associated with contamination of drinking water and bedding materials by botulinum spores. In addition, *Dermanyssus gallinae* (the poultry red mite) and flies were identified as potential contributors to the environmental persistence and amplification of *C. botulinum* within poultry production systems.

Rapid removal of carcasses, together with effective control of ectoparasites and flies, represents the most effective strategy for preventing and controlling avian botulism outbreaks.

INTRODUZIONE

Il botulismo è una malattia neuroparalitica che colpisce l'uomo e gli animali ed è causata dall'azione della sostanza biologica più tossica conosciuta in natura: la neurotossina botulinica (BoNT) (Gill, 1982). Questa malattia è considerata una patologia sporadica che, tra le specie allevate, interessa principalmente bovini e pollame.

Le neurotossine botuliniche sono classificate in sette sierotipi (o tipi), indicati con le lettere A, B, C, D, E, F e G. I sierotipi C e D, oltre a essere presenti nella loro forma pura, possono manifestarsi anche in forme mosaico CD o DC, a seconda che la componente antigenica prevalente sia quella del sierotipo C o del sierotipo D, rispettivamente (Peck *et al.*, 2017).

Il botulismo è una malattia inclusa tra quelle elencate alla lettera "B" dell'allegato "I" della Direttiva 2003/99/CE, nota come "direttiva zoonosi", tuttavia, le neurotossine e i ceppi di *Clostridium* che le producono, identificati nei focolai animali e umani, risultano nella quasi totalità dei casi profondamente differenti tra loro.

Il botulismo aviario è sostenuto quasi esclusivamente da neurotossine prodotte da clostridi appartenenti al gruppo III, riconducibili alla nuova geno-specie proposta *Clostridium novyi sensu lato*, che comprende al suo interno *Clostridium novyi* e *Clostridium haemolyticum* (Skarin *et al.*, 2011). Sebbene siano le neurotossine di tipo C, D e i loro mosaici (soprattutto il mosaico CD) a essere più frequentemente coinvolte negli episodi di botulismo aviario, rari casi di botulismo E e un caso da tipo A sono stati documentati in letteratura anche negli uccelli. Al contrario, il botulismo umano è causato essenzialmente dai sierotipi A, B, E e F e solo nel 1972 è stato riportato l'unico caso europeo sostenuto da sierotipo C.

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati dell'attività diagnostica nel campo del botulismo del pollame, condotti presso la Sezione di Treviso dell'IZS delle Venezie.

MATERIALI E METODI

Definizione di “sospetto” e “caso”

I casi di botulismo nel pollame sono stati raccolti nel periodo compreso tra il 2009 e il 2025.

È stato definito “caso” un episodio caratterizzato dal rilevamento della neurotossina botulinica nel siero oppure di clostridi produttori di tossina nell'intestino e/o nel fegato di soggetti deceduti appartenenti a gruppi di animali nei quali erano presenti individui con sintomatologia paralitica compatibile con botulismo (paralisi flaccida). Al contrario, viene definito “sospetto” un episodio di malattia del pollame con clinica e mortalità ascrivibili a botulismo, ma in cui gli accertamenti sopra-elencati hanno dato esito negativo.

Ricerca di neurotossine botuliniche

La ricerca di neurotossina botulinica da siero è stata eseguita mediante prova biologica (mouse test), considerata il test d'elezione per tale ricerca, condotta secondo la procedura del Centro di Referenza per il Botulismo presso l'Istituto Superiore di Sanità, che prevede l'impiego di antitossine sierotipo-specifiche fornite dal CDC di Atlanta (CNRB, 2023). Il campione è stato considerato positivo alla comparsa di sintomatologia neurologica compatibile con botulismo solo nei topini inoculati con il siero “tal quale” e non in quelli inoculati con i campioni trattati con antitossina.

Ricerca di Clostridi produttori di neurotossine botuliniche

La ricerca di Clostridi BoNT-produttori è stata condotta mediante real-time PCR specifica per geni codificanti neurotossine botuliniche, secondo quanto riportato in letteratura (Bano *et al.*, 2015). Brevemente, un grammo di contenuto intestinale e di fegato sono stati introdotti in 9 mL di Fortified Cooked Meat Medium (FCMM), sottoposto a shock termico a 71 °C per 10 minuti e quindi incubato per 48 ore a 37 °C in condizioni d'anaerobiosi.

I brodi colturali sono quindi stati sottoposti a real-time PCR per i tipi A, B, E ed F e a multiplex PCR per i tipo C, D e le loro varianti mosaico C/D e D/C (CRNB, 2023b; Anniballi *et al.*, 2013).

RISULTATI

Dal 2009 al 2025 sono stati diagnosticati presso la Sezione Diagnostica di Treviso 181 episodi di botulismo del pollame, a fronte dei 341 sospettati. La diagnosi è stata ottenuta attraverso l'evidenziazione della neurotossina nel siero o di Clostridi produttori nell'intestino e/o nel fegato di soggetti deceduti in gruppi di animali con individui che manifestano sintomatologia paralitica riconducibile a botulismo. Dei 181 focolai diagnosticati, 136 hanno interessato allevamenti da reddito e 45 rurali. Il grafico 1 riporta l'andamento dei casi sospettati e diagnosticati nel pollame, nell'arco temporale considerato (grafico 1).

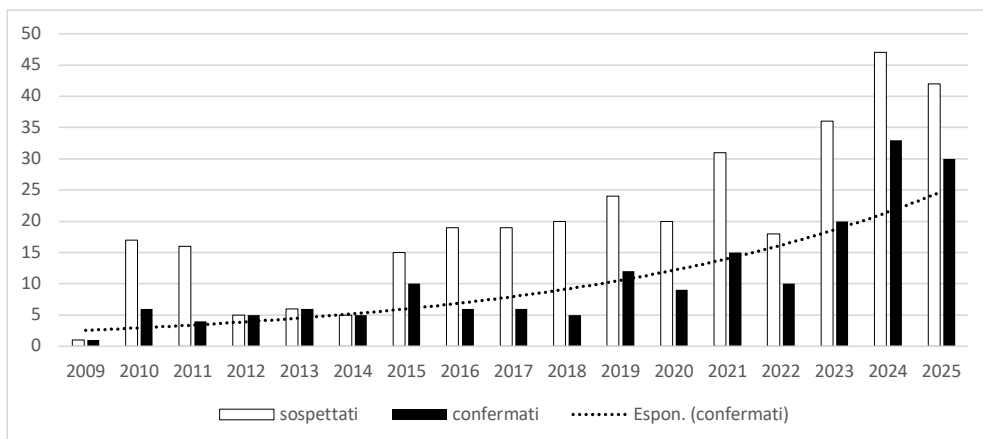


Grafico 1. Casi di botulismo del pollame confermati sui focolai sospettati dal 2009 al 2025.

Le specie aviari/indirizzi produttivi interessati dai focolai osservati nel comparto industriale, sono riassunti in Tabella 1. La maggior parte degli episodi è stata osservata nel pollo da carne (47%), seguito da gallina ovaiola (18%) e fagiano (11%) (Grafico 2).

Pollame	C	C/D	D	D/C	C/D + D/C	TOT.
Broiler	-	70	-	-	-	70
Ovaiola	-	24	-	-	2	26
Fagiano	-	16	-	-	-	16
Tacchino	-	14	-	-	-	14
Pernice rossa	-	4	1	-	-	5
Anatra	-	4	-	-	-	4
Pollo riproduttore	-	3	-	-	-	3
Quaglia	-	1	-	2	-	3
Starna	-	2	-	-	-	2
Coturnice	-	1	-	-	-	1
Oca	-	1	-	-	-	1

Tabella 1. Focolai diagnosticati nel pollame industriale suddiviso per specie e sierotipo implicato.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni è stato osservato un incremento dell'incidenza del botulismo aviare, non più limitato alla selvaggina allevata ma sempre più frequentemente riscontrato anche nel comparto della gallina ovaioia, del tacchino da carne e del broiler (Grafico 2). Tale aumento potrebbe essere attribuito, almeno in parte, alla maggiore disponibilità e diffusione di metodiche diagnostiche specialistiche presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS), che hanno consentito un miglioramento della capacità di rilevazione e conferma dei casi.

Tuttavia, non si può escludere il coinvolgimento di ulteriori fattori predisponenti, alcuni dei quali non ancora completamente identificati. Tra i fattori di rischio attualmente riconosciuti rivestono particolare importanza l'impiego di materiali da lettiera e la somministrazione di acqua contaminati da spore di *Clostridium botulinum* gruppo III, che possono favorire la persistenza e la diffusione dell'agente eziologico all'interno degli allevamenti. Il ruolo di tali matrici come fonti di contaminazione è stato confermato da studi di epidemiologia molecolare, nei quali l'isolamento e la caratterizzazione dei ceppi coinvolti hanno consentito di dimostrare la correlazione tra i microrganismi responsabili del focolaio e quelli rinvenuti nei campioni ambientali sospettati, quali lettiera e acqua (Bano *et al.*, 2013; Fillo *et al.*, 2021). Negli allevamenti di galline ovaiole è stato recentemente dimostrato il ruolo di *Dermanyssus gallinae* quale potenziale serbatoio e vettore di *Clostridium botulinum*, contribuendo al mantenimento e alla diffusione dell'agente patogeno all'interno delle strutture produttive (Zandonà *et al.*, 2025). Inoltre, in specie allevate in sistemi confinati, come la quaglia, è stato descritto un andamento epidemico della malattia associato alla diffusione del microrganismo da parte delle mosche, suggerendo che questi insetti possano rappresentare un efficace meccanismo di amplificazione della contaminazione ambientale anche in altre specie avicole (Palazzolo *et al.*, 2023).

In presenza di un focolaio di botulismo aviare, la misura di controllo più efficace per limitare la propagazione della malattia all'interno del gruppo consiste nella tempestiva rimozione e corretta eliminazione delle carcasse degli animali deceduti. Le carcasse, infatti, possono costituire una fonte diretta di intossicazione o tossinfezione per gli animali conviventi e rappresentano inoltre un substrato ottimale per lo sviluppo di larve di insetti necrofagi. Tali larve sono state identificate come vettori sia di neurotossine botuliniche sia di spore di *C. botulinum*, contribuendo in modo significativo al mantenimento e alla diffusione dell'infezione nell'ambiente di allevamento (Lee *et al.*, 1962; Anza *et al.*, 2014).

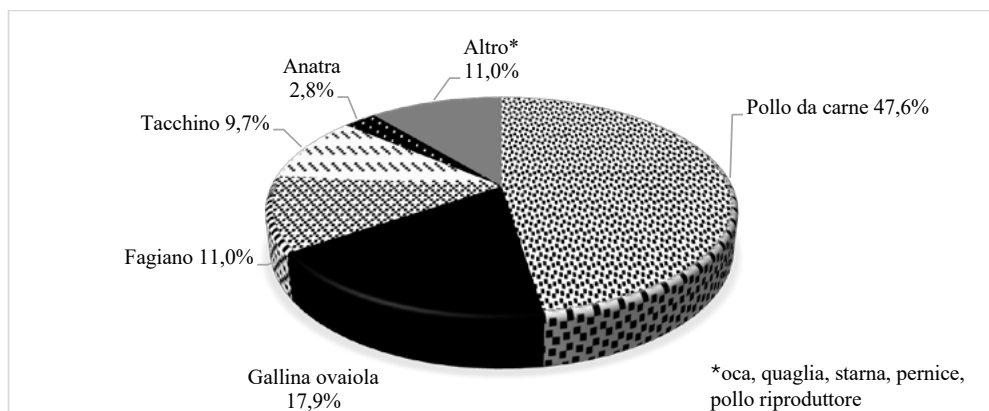


Grafico 2. Percentuali di episodi di botulismo nel comparto industriale ripartiti per specie animale o tipologia di produzione.

Nei volatili allevati per la produzione di carne e nella selvaggina da penna, oltre alla tempestiva rimozione delle carcasse, si sono dimostrati efficaci interventi terapeutici basati sull'impiego di antimicrobici nei confronti dei quali i ceppi di *Clostridium botulinum* gruppo III risultano generalmente sensibili. In particolare, l'utilizzo di tetracicline e antibiotici β -lattamici è stato associato a una riduzione della mortalità e della diffusione della malattia nei gruppi colpiti (Cordioli et al., 2024).

Nei contesti in cui il botulismo si manifesta in modo ricorrente e non sia possibile eliminare completamente la contaminazione ambientale, soprattutto a causa della persistenza delle spore nell'ambiente di allevamento, può essere presa in considerazione la profilassi vaccinale mediante l'impiego di vaccini stabulogeni. Tale approccio è adottato con una certa regolarità negli allevamenti di selvaggina da penna e, più raramente, nei gruppi di galline ovaiole, con l'obiettivo di ridurre l'impatto sanitario ed economico della malattia (Zandonà et al., 2025).

CONCLUSIONI

Il botulismo aviario rappresenta una patologia emergente nel settore avicolo, con un numero di casi in costante aumento negli ultimi anni per motivi non ancora completamente chiariti. I sierotipi di neurotossina coinvolti nei focolai osservati nel pollame allevato appartengono a *Clostridium botulinum* gruppo III e, nel nostro Paese, non sono mai stati associati a casi di botulismo umano; solo sporadiche segnalazioni sono state riportate in alcuni Paesi extraeuropei.

Alla luce di tali evidenze, risulta fondamentale approfondire la conoscenza dei fattori di rischio ancora non identificati che favoriscono l'introduzione e la diffusione dell'infezione negli allevamenti. Parallelamente, è necessario adottare misure di prevenzione mirate a contenere i fattori di rischio già noti, con particolare attenzione alla contaminazione da spore botuliniche dell'acqua di abbeverata e dei materiali impiegati per l'allestimento delle lettiere, riconosciuti come importanti fonti di introduzione e mantenimento dell'agente eziologico negli ambienti di allevamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Annibaldi, F., Auricchio, B., Woudstra, C., Fach, P., Fiore, A., Skarin, H., Bano, L., Seegerman, B., Knutsson, R., De Medici, D. (2013). Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecurity and Bioterrorism*, Suppl 1: S207-214.
2. Anza I, Vidal D and R Mateo. (2014). New insight in the epidemiology of avian botulism outbreaks: necrophagous flies as vectors of *Clostridium botulinum* type C/D. *Environmental Microbiology Reports*, 6: 738-743.
3. Bano L, Drigo I, Tonon E, Agnoletti F, Giovanardi D and E Morandini. (2013). Rice hulls as a possible source of *Clostridium botulinum* type C spores for poultry. *The Veterinary Record*, 173: 427.
4. 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.
5. CNRB. 2023. Metodo Per La Ricerca Di Clostridi Produttori Di Tossine Botuliniche e Per La Ricerca Di Tossine Botuliniche (Metodo Colturale e Mouse Test) 30.013 rev 3 del 20.01.2023. <https://www.iss.it/documents/20126/8159535/Metodo+CNRB30.013.pdf/6481393f-dfbd-2dfc-fda1-7d814ee0c74d?t=1674468668175>.
6. CRNB. 2023b. Metodo per la ricerca di Clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR. 32.013 rev.3. <https://www.iss.it/documents/20126/8159535/Metodo+CNRB31.013.pdf/d8911198-2857-2a85-4430-fe>

- d9e64503cd?t=1674468738237
7. Cordioli B, Rizzardi A, Guolo A, Ferro T, Bacchin C, Garbuio M, Anniballi F, De Santis P, Koene M, Le Marechal C, Skarin H, Seyboldt C and L Bano. (2024). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium botulinum* group III field strains isolated in Europe from animal outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 298: 110281.
 8. Fillo S, Giordani F, Tonon E, Drigo I, Anselmo A, Fortunato A, Lista F and L Bano. (2021). Extensive genome exploration of *Clostridium botulinum* group III field strains. *Microorganisms*, 9: 2347.
 9. Gill DM. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiological Reviews*, 46: 86-94.
 10. Lee VH, Vadlamudi S and RP Hanson. (1962). Blow fly larvae as a source of botulinum toxin for game farm pheasants. *The Journal of Wildlife Management*, 26: 411-413.
 11. Palazzolo L, Cordioli B, Camarda A, Cornaggia M, Di Castri A, Drigo I, Rizzardi A, Streparola G, Garbuio M, Viel L and L Bano. Epidemiological investigation in an outbreak of botulism occurred in commercial quails (*Coturnix coturnix*). Proceedings of the XXII WVPA Congress, Verona, September 4-8, 2023. P. 251.
 12. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, Cuervo P, Cheng LW, Derman Y, Dorner BG, Fisher A, Hill KK, Kalb SR, Korkeala H, Lindström M, Lista F, Lúquez C, Mazuet C, Pirazzini M, Popoff MR, Rossetto O, Rummel A, Sesardic D, Singh BR and SC Stringer. (2017). Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins*, 9: 38.
 13. Skarin H, Håfström T, Westerberg J and B Segerman. (2011). *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC genomics*, 12: 1-13.
 14. Zandonà L, Garbuio M, Guolo A, Drigo I, Moschioni C, Harper V, Anniballi F, Scalfaro C, Taglieri S and L Bano. 2025. Ruolo di *Dermanyssus gallinae* nel mantenimento del botulismo aviare in gruppi di ovaiole commerciali. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria, Napoli, 12-13 settembre. Pp. 261-265.
 15. Zandonà L, Tonon E, Genovese S, Garbuio M, Harper V, Drigo I, Viel L and L Bano. Valutazione in campo dell'efficacia di un vaccino inattivato per la prevenzione del botulismo in gruppi commerciali di ovaiole. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria, Napoli, 12-13 settembre. Pp. 266-270.

PROGETTARE LA SALUTE INTESTINALE PER RISULTATI PREVEDIBILI: *BACILLUS VELEZENSIS* PB6 E BUTIRRATO DI CALCIO INCAPSULATO A SUPPORTO DELLE PERFORMANCE ZOOTECHNICHE NEI TACCHINI

Zalewska E.¹, Czarniak P.¹, Casiro S.², Bukowska P.¹

¹Kemin Poland Sp. z o.o., ul. Puławska 303, 02-785 Warszawa, Poland

²Kemin Animal Nutrition and Health EMENA, Toekomstlaan 42, 2200 Herentals, Belgium

Summary

A commercial field trial conducted within a large turkey integration system in Poland evaluated the effect of a combined gut health strategy based on *Bacillus velezensis* PB6 and encapsulated calcium butyrate on turkey performance, intestinal stability, and economic outcomes. The intervention improved feed efficiency, survivability, and total production output, translating into a clear financial advantage under commercial conditions. Microbiome analysis suggested functional optimization of the gut ecosystem rather than simple compositional shifts, supporting the concept of predictable zootechnical performance through targeted nutritional interventions.

INTRODUZIONE

L'ottimizzazione della salute intestinale rappresenta una sfida fondamentale nella moderna produzione del tacchino, soprattutto in condizioni commerciali caratterizzate da elevata pressione microbiologica e da strategie alimentari intensive. Disbiosi e alterazioni dell'integrità intestinale sono associate a un ridotto assorbimento dei nutrienti, a una maggiore variabilità dei risultati produttivi e a un peggioramento delle performance zootecniche.

Queste criticità sono spesso correlate alla presenza di patogeni opportunisti, come *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, che possono proliferare in condizioni di microbiota alterato. Le strategie nutrizionali preventive, mirate al mantenimento dell'equilibrio del microbiota e della funzionalità della barriera intestinale, stanno assumendo un ruolo sempre più rilevante nel garantire costanza delle performance ed efficienza produttiva nei sistemi di allevamento del tacchino a ciclo lungo.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

È stato condotto uno studio di campo in condizioni commerciali, confrontando due gruppi allevati in condizioni gestionali sovrapponibili:

- Gruppo sperimentale: dieta standard integrata con *Bacillus velezensis* PB6 ATCC PTA-6737, 500 g/t + acido butirrico incapsulato, 400 g/t
- Gruppo di controllo: dieta standard senza supplementazione

Entrambi i trattamenti sono stati applicati da 0 a 12 settimane di età.

- Valutazione delle performance: 3 capannoni per ciascun trattamento e 3 capannoni di controllo
- Analisi del microbioma: 1 capannone rappresentativo per il gruppo trattato e 1 capannone rappresentativo per il gruppo di controllo; campionamento a metà ciclo produttivo su contenuto cecale, con 8 animali per gruppo
- Parametri valutati: peso corporeo, indice di conversione alimentare (FCR), mortalità, produzione totale e profilo del microbioma cecale

RISULTATI

A metà ciclo produttivo, i tacchini trattati con la strategia combinata per la salute intestinale hanno mostrato un peso corporeo medio superiore rispetto al gruppo di controllo (6,26 kg vs 6,03 kg), indicando una traiettoria di crescita iniziale più favorevole. Al termine del ciclo produttivo, questo vantaggio iniziale si è tradotto in un miglioramento evidente delle performance complessive. Il gruppo trattato ha evidenziato un indice di conversione alimentare inferiore (2,336 vs 2,403; $\Delta -0,066$), associato a un incremento della produzione totale (+6.541 kg) e a un maggior numero di capi avviati alla macellazione (+309).

La mortalità si è ridotta di 0,5 punti percentuali, mentre il peso corporeo finale è rimasto comparabile tra i gruppi. Ciò conferma che il miglioramento delle performance è stato determinato principalmente da una maggiore efficienza alimentare e da una migliore sopravvivenza, più che da un aumento della crescita individuale.

L'analisi del microbioma ha evidenziato differenze marcate nella struttura delle comunità batteriche tra i gruppi. I soggetti trattati sono risultati caratterizzati da un arricchimento di *Streptococcus spp.* e *Turicibacter*, mentre il gruppo di controllo ha mostrato una maggiore abbondanza di *Lactobacillus spp.* e batteri filamentosi segmentati. Questi risultati indicano che la strategia nutrizionale adottata ha modulato il microbiota intestinale verso uno stato funzionalmente distinto, suggerendo che i miglioramenti delle performance siano associati a una modifica della funzionalità dell'ecosistema microbico, più che a un semplice spostamento tra taxa batterici tradizionalmente considerati “benefici” o “dannosi”.

DISCUSSIONE

L'applicazione combinata di PB6 e butirrato incapsulato ha migliorato le performance zootecniche attraverso una maggiore efficienza di utilizzo dei nutrienti e un rafforzamento della robustezza complessiva del gruppo allevato. La riduzione dell'indice di conversione alimentare (FCR) riflette una migliore conversione del mangime, mentre l'aumento della produzione totale e della sopravvivenza indica una maggiore resilienza del sistema produttivo. Tali benefici possono essere inoltre associati a un miglioramento dell'integrità intestinale, inclusa una riduzione della permeabilità e un rafforzamento della barriera intestinale, contribuendo ulteriormente all'assorbimento dei nutrienti e alla stabilità dello stato sanitario (1).

I risultati dell'analisi del microbioma suggeriscono che gli esiti produttivi siano più strettamente correlati alle dinamiche funzionali dell'ecosistema microbico che alla sola presenza di taxa batterici tradizionalmente considerati benefici. Il butirrato ha verosimilmente contribuito al supporto dell'epitelio intestinale e alla modulazione dell'ambiente enterico, mentre PB6 ha favorito il mantenimento dell'equilibrio microbico in condizioni di pressione patogena.

Le variazioni microbiche osservate, inclusa una maggiore presenza di *Streptococcus spp.*, non sono state associate a effetti negativi sulla salute, indicando un processo di ristrutturazione adattativa del microbioma piuttosto che una condizione di disbiosi. È importante sottolineare che alcune popolazioni di *Streptococcus* possono contribuire a processi fermentativi favorevoli e che una maggiore diversità e abbondanza di batteri commensali può favorire l'occupazione delle nicchie ecologiche, limitando la proliferazione di varianti patogene in condizioni intestinali favorevoli. Questi risultati evidenziano l'importanza della sinergia ospite-microbioma nel supportare esiti produttivi stabili ed efficienti.

CONCLUSIONI

La combinazione di *Bacillus velezensis* PB6 e butirrato di calcio incapsulato ha migliorato l'efficienza alimentare, la produzione totale e la performance economica complessiva nella produzione commerciale del tacchino (Faulhaber, 2019; Adhikari et al., 2023). Questi risultati dimostrano che strategie mirate alla salute intestinale possono migliorare gli esiti zoo-

tecniche senza incrementare il peso corporeo finale, con la funzionalità del microbioma come fattore chiave alla base dei risultati osservati.

L'integrazione di approcci basati su probiotici e butirato supporta una produzione più prevedibile e robusta (Faulhaber, 2019; Adhikari et al., 2023), offrendo una soluzione pratica e scalabile per migliorare sia l'efficienza sia la redditività. In particolare, il miglioramento dell'indice di conversione alimentare ($-0,0663$) si è tradotto in una riduzione dei costi di circa 0,014 € per chilogrammo di peso vivo ($\approx 0,06$ PLN/kg), evidenziando un beneficio economico tangibile che diventa sempre più rilevante su scala commerciale, nonostante costi alimentari leggermente superiori nel gruppo trattato.

BIBLIOGRAFIA

1. Riferimenti a studi interni di Kemin.
2. Faulhaber, M.S. (2019). Encapsulated butyric acid and *Bacillus subtilis* as antibiotic substitutes to mitigate heat stress and promote gut health and performance in broilers. *Ph.D. Dissertation, University of Pretoria, South Africa*.
3. Adhikari, B., Myers, A.G., Ruan, C., Kwon, Y.M., and Rochell, S.J. (2023). Individual and combined effects of a direct-fed microbial and calcium butyrate on growth performance, intestinal histology and gut microbiota of broiler chickens. *Poultry* 2:63–81.

CARATTERIZZAZIONE E PROPAGAZIONE DEL VIRUS DELLA EGG DROP SYNDROME '76 (EDS-76) DA FOCOLAI DI GALLINE OVAIOLE STATUNITENSI

Carnaccini S.¹, Wang H.Y.¹, Abdallah A.¹, Gadu E.¹, Wilson D.², Trimble L.², Mouw M.², Sato Y.¹, El-Gazzar M.¹, Caceres J.C.¹

¹College of Veterinary Medicine, Iowa State University, 1800 Christensen drive, Ames, IA, 50011, United States

²Wilson Veterinary Co., 1409 Amy Lane, Franklin, IN, 46131, United States.

Summary

Egg Drop Syndrome 1976 (EDS-76), caused by *Barthadenovirus galloanseræ* (also known as *Duck Adenovirus 1* – *DadV-1*), is an emerging and increasingly widespread threat to the U.S. egg industry, leading to production of fragile, soft-shelled or shell-less eggs due to its damage to the oviduct. Control efforts are hindered by the lack of domestic viral isolates, forcing reliance on imported vaccines. In this study, DAdV-1 was successfully isolated and propagated from U.S. field samples using multiple substrates, with confirmation by qPCR, hemagglutination activity, electron microscopy, and whole genome sequencing. The isolate demonstrated sustained growth over multiple passages in duck embryonated eggs and various commercial substrates. This represents the first successful isolation and propagation of EDSV from U.S. clinical samples and provides a critical foundation for developing vaccines, improving diagnostics, and advancing understanding of disease pathogenesis.

INTRODUZIONE

La sindrome da caduta della ovodeposizione 1976 (Egg Drop Syndrome or EDS-76), causata da *Barthadenovirus galloanseræ* (anche noto come *Duck Adenovirus 1*, DadV-1), rappresenta una minaccia emergente e una delle principali preoccupazioni economico-sanitarie per l'industria delle galline ovaiole e dei riproduttori Statunitensi (Benkő M et al., 2022; Hurst-Proctor S et al., 2024). Il virus colpisce la porzione dell'ovidotto che contribuisce a formare il guscio dell'uovo, causando la produzione di uova fragili con guscio molle o assente (Hurst-Proctor S et al., 2024; McFerran JB, 1979). I primi focolai di EDS-76 sono stati diagnosticati in ovaiole in Pennsylvania nel 2018 e da allora, il virus si è diffuso a macchia d'olio in tutti gli stati confinanti ad alta produzione di uova. Recentemente, il primo focolaio di EDS-76 è stato diagnosticato in un allevamento commerciale di riproduttori di ovaiole in Iowa, lo Stato con il più alto numero di uova prodotte negli Stati Uniti (USDA-NASS, 2025). Attualmente, i tentativi di isolamento e propagazione virale negli Stati Uniti non hanno avuto successo (USPOULTRY, 2026), costringendo i produttori a fare affidamento su vaccini importati dall'Europa, con notevoli sfide logistiche e regolatorie. L'accesso ad isolati virali è essenziale per sviluppare vaccini autogeni e commerciali appropriati, validare i test diagnostici e studiare la patogenesi della malattia. Di conseguenza, il nostro lavoro mira a sviluppare e standardizzare un metodo efficace per isolare e propagare DadV-1 da campioni di campo statunitensi.

MATERIALI E METODI

Omogenati ottenuti da gusci e membrane d'uovo, e tamponi cloacali provenienti da soggetti clinicamente affetti e positivi alla qPCR per la EDS-76 sono stati inoculati su diversi substrati (colture cellulari e specific pathogen-free (SPF) uova embrionate di pollo e anatra) e incubati

a 37°C per un massimo di 10 giorni. I substrati inoculati sono stati monitorati quotidianamente e campionati ogni 48 ore. La microscopia elettronica diretta è stata effettuata su due campioni di isolati confermati positivi con la qPCR. Gli stessi isolati sono stati analizzati tramite Next Generation Sequencing sulla piattaforma Illumina MiSeq per ottenere il genoma completo e confermare assenza di contaminazioni. L'analisi filogenetica delle sequenze è stata effettuata utilizzando un metodo di maximum likelihood su allineamenti MUSCLE.

RISULTATI

L'isolamento virale è stato confermato mediante osservazione dell'effetto citopatico in colture cellulari, incremento delle copie genomiche rilevato tramite qPCR, evidenza di attività emoagglutinante e visualizzazione di particelle virali con morfologia compatibile con adenovirus in microscopia elettronica. Inoltre, il virus è stato propagato con successo in colture cellulari per oltre dieci passaggi consecutivi. Le analisi filogenetiche del genoma virale hanno evidenziato variazioni aminoacidiche nelle principali glicoproteine di superficie, fiber ed hexon.

DISCUSSIONE

Abbiamo isolato e caratterizzato con successo il virus dell'EDS-76 a partire da campioni di campo statunitensi, dimostrando inoltre una crescita stabile attraverso passaggi seriali. Attualmente, stiamo ottimizzando il protocollo per l'amplificazione su larga scala del virus, con l'obiettivo di sviluppare il primo vaccino di origine statunitense. La disponibilità di un vaccino basato su isolati americani è fondamentale non solo per superare le problematiche burocratiche legate all'importazione, ma anche per garantire una maggiore corrispondenza antigenica rispetto ai vaccini attualmente disponibili.

CONCLUSIONI

In conclusione, questo studio rappresenta il primo isolamento e la prima propagazione riusciti di DadV-1 negli Stati Uniti, ponendo le basi per futuri sforzi di sviluppo vaccinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Benkő M, Aoki K, Arnberg N, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022. *Journal of General Virology*. 2022;103(3):001721.
2. Hurst-Proctor S, Fulton RM, Gaydos T. Egg Drop Syndrome 76 in a U.S. Broiler Breeder Flock. *Avian Dis*. 2024 Sep;68(3):282-286. doi: 10.1637/aviandiseases-D-24-00019. PMID: 39400224.
3. McFerran JB. Egg drop syndrome, 1976 (EDS'76). *Vet Q*. 1979 Oct;1(4):176-80. doi: 10.1080/01652176.1979.9693744. PMID: 22039825.
4. U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service (NASS). (2025). Chickens and Eggs Summary 2024. USDA-NASS. Retrieved July 7, 2026, from USDA Iowa Chickens & Eggs Report
5. U.S. Poultry & Egg Association (USPOULTRY). (2026, April 9). Shedding light on egg drop syndrome: New research uncovers insights into virus transmission and vaccination response in poultry flocks. Feedstuffs. <https://www.feedstuffs.com/poultry/shedding-light-on-egg-drop-syndrome>

MONITORAGGIO E QUANTIFICAZIONE MEDIANTE REALTIME PCR (QPCR) DELL'ESCREZIONE FECALE DI AVIAN POLYOMAVIRUS IN UN GIOVANE PAPPAGALLO ECLETTICO (*ECLECTUS RORATUS*) CON INFEZIONE SUBCLINICA

Casalino G.¹, Messina D.², Bove A.¹, Lombardi R.¹, Salierno D.¹, Romito D.¹, Camarda A.¹, Circella E.¹

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

²Division 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

Summary

Avian polyomavirus (APyV) is an important pathogen affecting several avian species, particularly belonging to order Psittaciformes. APyV causes severe disease and death in nestlings and young birds. By contrast, the infection is often subclinical in adult birds. APyV is transmitted mainly through several biological matrices with direct contact. Feces are considered an important potential source of contamination. Therefore, the aim of this study was to monitor for a long period a young *Eclectus* parrot (*Eclectus roratus*) with subclinical infection, monitoring for possible fecal excretion of the virus. The parrot came from a hand-raised facility. APyV infection was diagnosed by PCR from feathers. The parrot was three months old when monitoring began. Fecal samples were collected daily during the first four months and subsequently every five days for two months, for a total period of six months of monitoring. All samples were analysed by quantitative real-time PCR (qPCR). The highest viral DNA loads were observed during the first two months, with the highest value, 5.63×10^3 DNA copy number/ng, on day 19. Over the next 2 months, the highest value was 8.92×10^3 copy number/ng detected on day 84. Subsequently, a progressive decrease in viral shedding was found, with 6.11×10^1 copy number/ng detected as the highest value during the last two months of monitoring. Although samples taken on days were negative, suggesting that viral shedding does not occur every day, APyV was detected throughout the entire monitoring period, including day 180, showing persistent shedding through the feces. These findings suggest that clinically healthy birds can release APyV through feces, even in high amounts, for at least six months, posing a significant risk of infection for other parrots belonging to susceptible species. Using a sensitive method such as real-time PCR, the feces were found to be a suitable sample that could be used to screen parrots before each move and introduction into farms or settings where other parrots are present.

INTRODUZIONE

Avian polyomavirus (APyV) è un virus a DNA appartenente alla famiglia *Polyomaviridae*, responsabile di infezioni in numerose specie aviarie, in particolare oche e specie appartenenti all'ordine *Psittaciformes*, ed è causa di ripercussioni sanitarie ed economiche negli allevamenti commerciali e nei centri di svezzamento (Wang et al., 2022). Sebbene decorra in forma subclinica negli esemplari adulti, l'infezione può determinare forme cliniche particolarmente gravi nei giovani individui e nei nidiacei, caratterizzate da elevata mortalità e lesioni a carico di numerosi organi quali fegato, reni, milza e sistema nervoso (Phalen et al., 1993). Il virus replica, inoltre, nei tessuti linfoidi, causando immunosoppressione e predisponendo pertanto

i soggetti colpiti ad altre infezioni opportunistiche. La trasmissione del virus avviene per contatto diretto tra animali infetti o portatori asintomatici del virus e soggetti sani. Il coinvolgimento di nidiacei e soggetti particolarmente giovani ha portato ad ipotizzare la trasmissione verticale dell'infezione per numerosi anni. Nel 2018, è stata evidenziata la presenza di GHPV (Goose hemorrhagic polyomavirus) in alcune uova di oca in un allevamento infetto (Wan et al., 2018). Recentemente, la trasmissione verticale del virus è stata evidenziata nei fringillidi (Casalino et al., 2025). APyV è stato riscontrato in una elevata percentuale di uova non schiuse, sia infertili sia con mortalità embrionale, lasciando ipotizzare il possibile ruolo del virus nell'insorgenza di questi problemi. Tuttavia, la trasmissione orizzontale riveste particolare importanza in quanto, durante la fase viremica dell'infezione, APyV raggiunge numerosi organi bersaglio e può essere eliminato dal volatile infetto attraverso feci, componente uratica, piume e desquamazioni cutanee, contaminando superfici, nidi, incubatrici e attrezzature di allevamento dove, grazie alla sua elevata resistenza ambientale, rendendo la contaminazione ambientale una ulteriore via indiretta di trasmissione del virus (Phalen et al., 1993; Phalen et al., 1995; Phalen et al., 1996; Circella et al., 2017; El-Shahidy et al., 2018; Ma et al., 2019; Wang et al., 2022; Liu et al., 2022). Nonostante le feci rappresentino uno delle fonti potenzialmente più importanti per la diffusione ambientale di APyV (Phalen et al., 2000; Potti et al., 2007), non vi sono studi sulla dinamica di eliminazione fecale del virus nei volatili infetti e i dati relativi all'escrezione fecale sono scarsi e frammentari. Alcune ricerche, anche se effettuate monitorando gruppi di pappagalli in allevamenti infetti mediante PCR convenzionale e attraverso campionamenti piuttosto sporadici nel tempo, ad intervalli corrispondenti anche a più di un mese (Phalen, 1993; Phalen et al., 2000), hanno evidenziato che il virus può persistere tra i volatili potenzialmente anche per diverso tempo. Lo scopo di questa ricerca è stato quello di monitorare con campionamenti molto ravvicinati e puntuali, e per lungo tempo, l'escrezione fecale di APyV in un giovane pappagallo ecletto (*Eclectus roratus*), clinicamente guarito, al fine di valutare il rischio epidemiologico rappresentato dai volatili con questo stato sanitario in contesti dove sono in contatto diretto o indiretto con altri esemplari.

MATERIALI E METODI

Soggetto monitorato

Lo studio è stato condotto su un giovane esemplare di pappagallo ecletto, di circa tre mesi di età al momento dell'inizio del monitoraggio. Il soggetto proveniva da un centro di svezamento in cui convergevano numerosi pappagalli provenienti da differenti allevamenti, per la rivendita a negozi di animali o direttamente a privati. La proprietaria aveva ricevuto il soggetto in sostituzione di un altro esemplare di ecletto, che era stato acquistato presso lo stesso centro ma era deceduto dopo due giorni di detenzione privata per infezione da APyV, diagnosticata presso la Sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari. Il nuovo esemplare, oggetto del monitoraggio, nei primi 3-4 giorni successivi all'arrivo presso il domicilio della proprietaria, aveva mostrato sintomi aspecifici, con lieve letargia e leggero arruffamento del piumaggio. Nonostante la sintomatologia fosse successivamente regredita con apparente ritorno ad una condizione di normalità, considerata l'anamnesi, il pappagallo è stato sottoposto a screening molecolare per APyV secondo un protocollo già descritto (Circella et al., 2017), analizzando cinque piume prelevate dal dorso e dalla regione interscapolare. In seguito alla positività del test è stato programmato il monitoraggio per valutare l'escrezione virale attraverso le feci.

Monitoraggio

Il monitoraggio è stato eseguito per un periodo complessivo di 6 mesi, durante i quali i cam-

pioni di feci sono stati raccolti giornalmente per i primi quattro mesi dalla proprietaria, in provette sterili ed etichettate con la data di raccolta, fornite dalla sezione di Patologia aviaria del Dipartimento. Conservati mediante congelamento, i campioni sono stati ritirati settimanalmente, mantenendo la catena del freddo, e trasferiti presso la sezione. Successivamente, considerato l'enorme impegno per la proprietaria che aveva portato a non poter ottenere e analizzare i campioni relativi ad alcuni giorni, la raccolta dei campioni è stata rimodulata, ed eseguita ogni 5 giorni per i successivi due mesi, secondo le modalità appena descritte. Tutti i campioni sono stati analizzati mediante real-time PCR quantitativa (qPCR).

Real-time PCR

Il DNA è stato estratto con kit commerciale ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, USA) secondo le istruzioni della casa produttrice, partendo da 200 mg di ciascun campione. Le reazioni per real-time PCR (qPCR) sono state preparate utilizzando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Milano, Italia) in un volume finale di 20 μ L, contenente 18 μ L di mix di reazione e 2 μ L di DNA estratto. Sono stati utilizzati i primers APVgenf (5'-CTDGATGARAATGGGGTKGG-3') e APVgenr (5'-ACMCGWACYTC-CTCMACCT-3') alla concentrazione di 5 pmol/ μ L. Le amplificazioni sono state eseguite mediante sistemi QuantStudio 6 (Applied Biosystems) e Bio-Rad CFX Maestro Connect applicando il seguente protocollo termico: denaturazione iniziale a 98 °C per 3 minuti, 39 cicli a 98 °C per 15 secondi e 60 °C per 45 secondi. La specificità dell'amplificazione è stata verificata mediante analisi della curva di melting con incremento graduale della temperatura da 65 °C a 95 °C ogni 0,5 °C per 5 secondi. Tutte le reazioni sono state effettuate in triplicato. Per la curva standard è stato utilizzato un plasmide ricombinante contenente l'amplicone APV clonato in *Escherichia coli* MACH1. Il numero di copie genomiche è stato calcolato mediante diluizioni seriali decimali fino a 10^{-4} . La quantità di DNA totale di ciascun campione è stata misurata mediante spettrofotometro Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, USA). I risultati finali sono stati espressi come copie genomiche virali/ng di DNA totale.

RISULTATI

Il DNA virale è stato individuato per tutto il periodo di monitoraggio in quantità piuttosto elevate, ma decrescenti nel tempo (Figure 1 e 2). Nel dettaglio, durante il primo bimestre (dal giorno 1 al giorno 60) sono stati riscontrati i maggiori quantitativi di DNA virale, con il valore massimo registrato pari a $5,63 \times 10^4$ numero di copie /ng di DNA in corrispondenza del giorno 19, mentre il valore minimo pari a $1,20 \times 10^2$ numero di copie/ng di DNA rilevato il giorno 55. Durante questi primi due mesi di monitoraggio, il DNA virale non è stato rilevato nei campioni raccolti nei giorni 4, 23 e 24. Durante il secondo bimestre (dal giorno 61 al giorno 120) si è osservata una progressiva diminuzione dell'escrezione virale, con valori generalmente inferiori rispetto al primo bimestre e con il valore più alto pari a $8,92 \times 10^3$ numero di copie /ng DNA registrato il giorno 84 e quello più basso, pari a $6,46 \times 10^0$ numero di copie/ng DNA, il giorno 110. Nel secondo bimestre il virus non è stato rilevato nei giorni 83, 90, 113, 117. Nell'ultimo bimestre, in cui dal giorno 135 in poi i campioni sono stati raccolti come già specificato ogni 5 giorni, è stata riscontrata una tendenza ad una graduale riduzione dell'escrezione virale, con il quantitativo massimo ritrovato in corrispondenza del giorno 150 ($6,11 \times 10^1$ numero di copie/ng di DNA), e quello minimo registrato il giorno 160 ($4,35 \times 10^0$ numero di copie/ng di DNA). Nella prima parte dell'ultimo bimestre, in cui i campionamenti erano ancora giornalieri (dal giorno 121 al giorno 135), il DNA virale non è stato evidenziato nei giorni 121 e 123, mentre nella parte successiva caratterizzata dai campionamenti ogni 5 giorni il virus è stato rilevato in tutti i campioni analizzati fino all'ultimo giorno di monitoraggio (giorno 180).

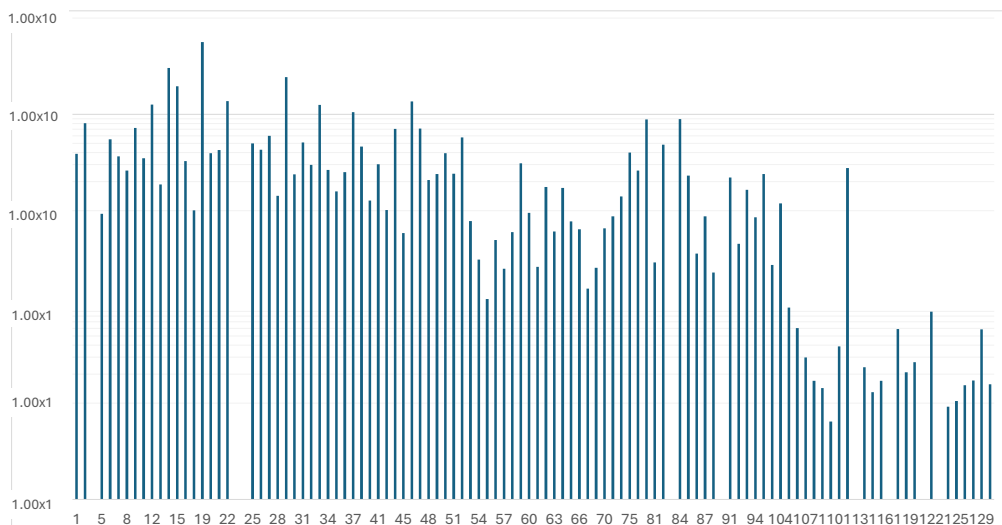


Figura 1. Escrezione fecale di APyV durante i primi quattro mesi di monitoraggio (dal 1° al 130° giorno) valutata mediante campionamenti giornalieri.

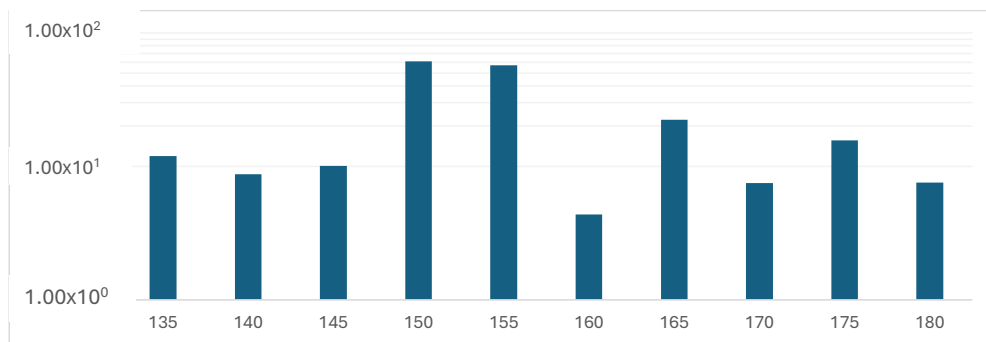


Figura 2. Escrezione fecale di APV negli ultimi 2 mesi di monitoraggio (dal 135° al 180° giorno) analizzando campioni prelevati ogni 5 giorni.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti evidenziano che un esemplare infetto può eliminare il virus attraverso le feci per un periodo di tempo molto lungo, che raggiunge e probabilmente supera i 6 mesi confermando che i soggetti clinicamente sani possono rappresentare importanti fonti di diffusione di APyV, come ipotizzato in studi precedenti (Ogawa et al., 2006; Valastanova et al., 2021). In particolare, durante i primi mesi post-infezione, il virus viene eliminato attraverso le feci in elevate cariche. Questo materiale biologico rappresenta quindi una fonte molto importante di contaminazione degli ambienti in cui soggiorna l'animale e delle attrezzature, considerando che APyV è caratterizzato da una elevata resistenza ambientale, favorita anche dall'assenza dell'envelope (Gregersen e Roth, 2012). La giovane età del soggetto ha sicuramente avuto un ruolo importante nell'elevata

escrezione virale osservata. È noto infatti che, oltre ad eventuali coinfezioni, condizioni di stress e fattori ambientali avversi, la giovane età può influenzare la replicazione virale e la quantità di virus eliminata (Shini et al., 2008; Gervasi et al., 2017; Bil-Lula et al., 2018; Zhai et al., 2024;) e che i soggetti di età inferiore ai sei mesi mostrano una maggiore suscettibilità all'infezione da APyV rispetto agli adulti (Khosravi et al., 2024), probabilmente in relazione all'immaturità immunitaria e alle interazioni tra l'ospite e il virus (Wang et al., 2020). La graduale riduzione dei quantitativi di virus escreti osservata durante i mesi di monitoraggio potrebbe essere ricollegata anche alla crescita del volatile infetto, oltre all'allontanamento temporale dalla fase di insorgenza dell'infezione. La scelta di adottare per questo studio la real-time PCR per le analisi, rispetto a studi precedenti basati su PCR convenzionale e metodiche equivalenti, ha consentito di ottenere specifiche informazioni sulla dinamica dell'escrezione virale, evidenziandone la persistenza e la continuità. Infatti, la minore sensibilità della PCR convenzionale rispetto alla real-time PCR (qPCR) può comportare una ridotta capacità di rilevare basse cariche virali, soprattutto in matrici biologiche complesse (Okuda et al., 2011; Gunes et al. 2012) ricca di sostanze potenzialmente inibenti la PCR, che possono generare falsi negativi (Acharya et al., 2017; Das et al., 2009). La real-time PCR, invece, rilevando APyV anche quando presente nei campioni in cariche molto basse, si è confermata una tecnica altamente sensibile e specifica e si è mostrata molto utile nel rilevare l'infezione anche in soggetti asintomatici e utilizzando matrici biologiche complesse come le feci (Katoh et al., 2008). Anche la modalità di campionamento, giornaliero per quasi tutto lo studio, ha consentito di evidenziare alcuni aspetti peculiari della dinamica di escrezione fecale di APyV. Infatti, sebbene DNA virale sia stato riscontrato quasi costantemente durante il monitoraggio, l'escrezione virale non è stata continua ma con alcune intermittenze legate a campioni risultati negativi, che sono stati evidenziati proprio nel periodo in cui i campionamenti erano giornalieri.

CONCLUSIONI

Questo studio evidenzia l'importanza epidemiologica rivestita da esemplare con infezione sub-clinica da APyV i quali, non mostrando più alcun sintomo, possono diffondere il virus attraverso le feci in elevata carica, soprattutto nei primi mesi post-infezione, e in maniera pressoché continua per lunghi periodi di tempo. Queste osservazioni sottolineano l'importanza di rigorose misure di biosicurezza, soprattutto in contesti ad elevata densità animale, quali allevamenti commerciali, fiere, negozi di animali e centri di svezamento, dove il sovraffollamento e il contatto tra specie differenti favoriscono la diffusione del virus e possono influenzare la comparsa di manifestazioni cliniche (Ritchie et al., 1998; Doneley, 2018). Pertanto, considerati i dati ottenuti, sarebbe auspicabile monitorare lo stato sanitario degli esemplari prima di ogni introduzione in un allevamento o altro contesto in cui sono presenti altri volatili, adottando metodiche altamente sensibili come la qPCR che consentono lo screening da campioni fecali che rappresentano una matrice complessa, ma anche una tipologia di campione facile da raccogliere e non invasivo per l'animale.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano vivamente Luana De Ruvo, proprietaria dell'esemplare di ecletto monitorato in questo studio, che con la sua pazienza e dedizione nel raccogliere i campioni ha consentito l'intera esecuzione della ricerca.

BIBLIOGRAFIA

1. Wang CW, Chen YL, Mao SJ, Lin TC, Wu CW, Thongchan D, Wang CY, Wu HY. (2022). Pathogenicity of avian polyomaviruses and prospect of vaccine development. *Viruses*, 14, 2079.
2. Phalen DN, Wilson VG, Graham DL. (1993). Organ distribution of avian polyomavirus DNA and virus-neutralizing antibody titers in healthy adult budgerigars. *American journal of veterinary research*, 54, 2040-2047.
3. Wan C, Cheng LF, Fu G, Chen C, Liu R, Shi S, Huang Y. (2018). Rapid detection of goose hemorrhagic polyomavirus using TaqMan quantitative real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 39, 61–64.
4. Casalino G, Messina D, Pellegrini F, D’Amico F, Bozzo G, Salierno D, Circella E. (2025). Vertical transmission of avian polyomavirus during natural infection. *The Veterinary Journal*, 314, 106490.
5. Phalen DN, Wilson BG, Graham DL. (1995). Production of avian polyomavirus sero-negative budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) from seropositive adults. *Avian Diseases*, 39, 897–899.
6. Phalen DN, Wilson VG, Graham DL. (1996). Characterization of the avian polyomavirus-associated glomerulopathy of nestling parrots. *Avian diseases*, 140-149.
7. Circella E, Caroli A, Marino M, Legretto M, Pugliese N, Bozzo G, Cocciolo G, Dibari D, Camarda A. (2017). Polyomavirus infection in Gouldian finches (*Erythrura gouldiae*) and other pet birds of the family Estrildidae. *Journal of Comparative Pathology*, 156, 436–439.
8. El-Shahidy M, Helal I, Noaman S. (2018). Studies on Circo and Polyoma Viruses in Psittacine Birds in Egypt, During 2014–2016. *Suez Canal Veterinary Medical Journal (SCVMJ)*, 23(2), 201–214.
9. Ma J, Wu R, Tian Y, Zhang M, Wang W, Li Y, Tian F, Cheng Y, Yan Y, Sun J. (2019). Isolation and characterization of an Aves polyomavirus 1 from diseased budgerigars in China. *Veterinary Microbiology*, 237, 108397.
10. Liu FL, Chang SP, Liu HJ, Liu PC, Wang CY. (2022). Genomic and phylogenetic analysis of avian polyomaviruses isolated from parrots in Taiwan. *Virus Research*, 308, 198634.
11. Phalen DN, Radabaugh CS, Dahlhausen RD, Styles DK. (2000). Viremia, virus shedding, and antibody response during natural avian polyomavirus infection in parrots. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217, 32-36.
12. Potti J, Blanco G, Lemus JÁ, Canal D. (2007). Infectious offspring: how birds acquire and transmit an avian polyomavirus in the wild. *PLoS One*, 2(12), e1276.
13. Ogawa H, Chahota R, Hagino T, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H. (2006). A survey of avian polyomavirus (APV) infection in imported and domestic bred psittacine birds in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(7), 743–745.
14. Valastanova M, Psikal I, Knotek Z, Smid B, Literak I. (2021). Psittacine beak and feather disease virus and avian polyomavirus detection rate in 823 clinically healthy captive parrots in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 66, 87–96.
15. Gregersen JP, Roth B. (2012). Inactivation of stable viruses in cell culture facilities by peracetic acid fogging. *Biologicals*, 40(4), 282–287.
16. Shini S, Kaiser P, Shini A, Bryden WL. (2008). Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and food deprivation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122(1–2), 106–116.
17. Gervasi SS, Burgan SC, Hofmeister E, Unnasch TR, Martin LB. (2017). Stress hormones predict a host superspreader phenotype in the West Nile virus system. *Proceedin-*

- gs of the Royal Society B: Biological Sciences, 284(1859), 20171090
18. Bil-Lula I, Woźniak M. (2018). Co-infection with human polyomavirus BK enhances gene expression and replication of human adenovirus. *Archives of Virology*, 163(7), 1841–1849
 19. Zhai T, Zhang Y, Wang W, Tian Y, Wu R, Ma J, et al. (2024). Identification of avian polyomavirus and its pathogenicity to chickens. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1320264.
 20. Khosravi M, Samakhah SA, Khoshbakht R, Mamouri KS. (2024). Avian polyomavirus among psittacine birds in Iran: molecular detection rate and associated risk factors. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 38(1), 7–14.
 21. Wang Y, Liu Y, Deng W, Fu F, Yan S, Yang H, et al. (2020). Viral integration in BK polyomavirus-associated urothelial carcinoma in renal transplant recipients: multistage carcinogenesis revealed by next-generation virome capture sequencing. *Oncogene*, 39(35), 5734–5742.
 22. Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H, Fukushi H. (2011). Detection of Chlamydophila psittaci by using SYBR green real-time PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(2), 249–254.
 23. Günes A, Marek A, Grafl B, Berger E, Hess M. (2012). Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *Journal of Virological Methods*, 183(2), 147–153.
 24. Acharya KR, Dhand NK, Whittington RJ, Plain KM. (2017). PCR inhibition of a quantitative PCR for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis DNA in feces: diagnostic implications and potential solutions. *Frontiers in Microbiology*, 8, 115.
 25. Das A, Spackman E, Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL. (2009). Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of avian influenza virus by RT-PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6), 771–778.
 26. Katoh H, Ohya K, Fukushi H. (2008). Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *Journal of Virological Methods*, 154(1–2), 92–98.
 27. Ritchie BW, Latimer KS, Leonard J, Pesti D, Campagnoli R, Lukert PD. (1998). Safety, immunogenicity, and efficacy of an inactivated avian polyomavirus vaccine. *American Journal of Veterinary Research*, 59(2), 143–148.
 28. Doneley B. (2018). *Avian Medicine and Surgery in Practice: Companion and Aviary Birds*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

SIEROTIPIZZAZIONE, STUDIO DEI FATTORI DI VIRULENZA E DELL'ANTIMICROBICO-RESISTENZA DI CEPPI PATOGENI DI *ESCHERICHIA COLI* AVIARI (APEC) ISOLATI NEL 2026 IN ALLEVAMENTI DI GALLINE OVAIOLE DA CONSUMO E RIPRODUTTORI PESANTI

Cirasella L.¹, Fiorentini L.¹, Perulli S.¹, Siclari C.¹, Barbieri I.², Merialdi G.³, Brandi A.¹, Fabbri G.⁴, Tosi G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna, Sede Territoriale di Forlì, Via Don Eugenio Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC), Italia

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna, Laboratorio di BATTERIOLOGIA Specializzata, Reparto Tecnologie Biologiche Applicate, Via A.Bianchi 9, 25124 Brescia (BS), Italia.

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna, Sede Territoriale di Reggio Emilia, Via Pitagora 2, 42100 Reggio Emilia (RE), Italia.

⁴Corso Giuseppe Garibaldi 144, 47122 Forlì (FC), Italia

Summary

A study was conducted on 50 outbreaks of avian colibacillosis observed in 2026 in flocks of laying hens and broiler breeders. *E. coli* strains isolated from organs exhibiting lesions were submitted to serotyping and screening for virulence factors using molecular methods. Furthermore, the antimicrobial resistance profile was determined for each isolated strain. Serotype O2 proved to be the most frequent among the strains included in the study. Numerous strains were found not to belong to the tested serotypes. The study revealed the presence of numerous genes encoding one or more virulence factors with a prevalence exceeding 80% for 9 of the 15 virulence factors studied.

The combined study of antigenic characteristics, virulence factors and the AMR profile can provide valuable information for diagnostic and epidemiological purposes, as well as for the preparation of autogenous vaccines.

INTRODUZIONE

La colibacillosi è tra le malattie più diffuse nel settore avicolo e provoca infezioni responsabili di gravi perdite economiche con conseguenze negative sul benessere delle specie allevate. È causata da ceppi di *Escherichia coli* aviari patogeni (APEC), che appartengono al gruppo degli *E.coli* patogeni extraintestinali (ExPEC). La colibacillosi aviaria comprende svariate forme cliniche associate a lesioni localizzate o sistemiche. Nella gallina ovaiole e nei riproduttori pesanti la forma clinica più frequentemente osservata, in fase di deposizione, è caratterizzata da un aumento di mortalità e da una polisierosite fibrinosa che coinvolge pericardio, sacchi aerei, fegato e apparato riproduttore. Gli APEC infettano l'ospite prevalentemente per via respiratoria, anche se non è da escludere la trasmissione orale e cloacale. La colonizzazione dell'apparato respiratorio è cruciale nella patogenesi della malattia ed è favorita da una serie di fattori di virulenza degli APEC e soprattutto da una riduzione delle difese immunitarie dell'ospite. Per questo motivo la colibacillosi aviaria viene considerata prevalentemente una patologia condizionata da una serie di fattori predisponenti di natura ambientale, manageriale e infettiva. Dopo aver colonizzato l'apparato respiratorio gli APEC diffondono nell'organismo attraverso sacchi aerei e mucose determinando una patologia di tipo sistemico. È possibile anche una fase batteriemia. Gli APEC vengono classificati in sie-

rotipi in base alle caratteristiche antigeniche dell'antigene somatico "O"; i sierotipi O1, O2 e O78 sono considerati i più frequenti anche se recentemente è stato descritto un incremento dei casi di colibacillosi, a livello mondiale, sostenuti dai sierotipi O9 e O145 (Nawaz et al., 2024). È possibile anche una classificazione degli APEC su base filogenetica, mentre sono in costante aumento gli studi sui fattori di virulenza degli APEC che includono adesine, invasive, sistemi di acquisizione del ferro, protectine, tossine quorum-sensing systems, sistemi secretori e two-component systems (Kunert Filho et al., 2015). Negli animali in deposizione il controllo della colibacillosi mediante la terapia antibiotica è fortemente limitato dalle restrizioni all'impiego degli antimicrobici e dall'assenza di principi attivi privi di tempi di sospensione. Occorre pertanto un efficace controllo dei fattori predisponenti. La vaccinazione rappresenta una valida strategia e si basa sull'impiego di vaccini vivi deleti e/o di autovaccini allestiti con uno o più ceppi di APEC isolati in corso di malattia. Per un corretto approccio all'allestimento degli autovaccini è tuttavia necessaria un'accurata selezione dei ceppi di APEC circolanti in allevamento.

Il presente studio ha preso in considerazione 50 casi clinici recenti di colibacillosi osservati in galline ovaiole da consumo e riproduttori pesanti in fase di deposizione; i ceppi di APEC isolati dagli organi sede di lesione sono stati sierotipizzati e sottoposti ad un'indagine di tipo molecolare per valutare la presenza di geni codificanti per i fattori di virulenza finora conosciuti.

È stato inoltre determinato, per ogni ceppo, il profilo di antimicrobico-resistenza (AMR) considerando il risultato di studi recenti che caratterizzano gli APEC come potenziali zoonotici a trasmissione alimentare, con caratteristiche genetiche simili a UPEC (human uropathogenic *E. coli*) e NMEC (neonatal meningitis *E. coli*) (Markland et al., 2015; Mellata et al., 2013; Gambi et al., 2022).

MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 50 casi clinici di colibacillosi osservati, nel corso del 2026, in gruppi di galline ovaiole da consumo in deposizione (26 casi) e di riproduttori pesanti in fase di deposizione (24 casi) distribuiti nella provincia di Forlì-Cesena (25 casi) e in altre 15 province italiane. Dalle carcasse che presentavano lesioni macroscopiche riconducibili a colibacillosi sono stati prelevati gli organi sede di lesione e sottoposti ad esame batteriologico. Ogni campione è stato seminato su piastre di Agar Sangue e di Hektoen Enteric Agar (terreno selettivo per le *Enterobacteriaceae*), incubati overnight a 37°C per 24-48h. Le colonie sospette sono state identificate utilizzando il sistema biochimico miniaturizzato, EnteroPluri-Test (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia) e su ogni ceppo è stata eseguita la microdiluizione in brodo, per determinare la MIC (Minima Concentrazione Inibente) e, di conseguenza, il profilo di sensibilità antibiotica. La minima concentrazione inibente (MIC) è stata eseguita utilizzando piastre Thermo Scientific™ Sensititre™ e i valori sono stati interpretati utilizzando i breakpoint CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e, quando non presenti, EUCAST.

I ceppi di *E. coli* oggetto dello studio sono stati testati per l'identificazione dell'antigene somatico "O" tramite il test di sieroagglutinazione lenta a caldo che permette di identificare i seguenti antigeni somatici: O1, O2, O5, O8, O9, O15, O18, O20, O22, O26, O45, O49, O55, O64, O78, O86, O88, O101, O103, O111, O113, O111, O113, O118, O128, O138, O139, O141, O147, O149, O153 e O157. Gli stessi ceppi sono stati testati per l'identificazione dei fattori di virulenza mediante l'impiego del kit di Real Time PCR Kylt® APEC qPCR (AniCon Labor GmbH, DE) in grado di determinare i geni codificanti per 15 fattori di virulenza (appartenenti ai gruppi delle adesine, tossine, invasive, sistemi di acquisizione del ferro, protectine, proteasi, emolisine, fattori di resistenza al siero) (Tabella 1). L'estrazione del DNA è stata eseguita a partire da una colonia pura stemperata in H₂O sterile sfruttando il metodo di estrazione per bollitura che crea

shock termico alle membrane cellulari, ottenendo così il rilascio dell'acido nucleico. Sono state allestite le piastre di amplificazione aliquotando 16 µl delle mix già pronte all'uso del kit Kylt®, cui sono stati addizionati 4 µl di DNA estratto. Ogni mix contiene, oltre a tutti i reattivi necessari per l'amplificazione, 4 coppie di primers che permettono l'identificazione dei geni (riportati in tabella 1) dei principali fattori di virulenza. Fa eccezione la mix 1 che contiene 3 coppie di primers appartenenti ai fattori di virulenza e una coppia di primers dell'Internal Control.

Tabella 1: Sintesi delle mix del kit Real Time PCR Kylt® APEC qPCR (AniCon Labor GmbH, DE) relative all'amplificazione dei fattori di virulenza.

MIX	Group	Virulence factor	Description
MIX1	Iron acquisition	<i>irp2</i>	Iron-repressible protein (yersiniabactin synthesis)
	Adhesins	<i>papC</i>	Pilus associated with pyelonephritis
	Adhesins	<i>tsh</i>	Temperature-sensitive hemagglutinin
Mix2	Adhesins	<i>F11</i>	Serotype F11 of P fimbriae
	Toxins	<i>EAST1 (astA)</i>	Heat-stable cytotoxin associated with enteroaggregative E.coli
	Invasins	<i>iucD</i>	Aerobactin synthesis
	Protectins/ Serum resistance	<i>iss</i>	Increased serum survival
Mix3	Toxins	<i>vat</i>	Vacuolating autotransporter toxin
	Invasins	<i>ibeA</i>	Invasion of brain endothelium
	Iron acquisition	<i>ironN</i>	Catecholate siderophore (salmochelin) receptor
	Protectins/ Serum resistance	<i>cvi/cva</i>	Structural genes of colicin V operon (microcin ColV)
Mix4	Iron acquisition	<i>sitA</i>	Iron transport system
	Iron acquisition	<i>iutA</i>	Aerobactin receptor
	Miscellaneous	<i>ompT</i>	Outer membran protein, protease
	Miscellaneous	<i>hlyF</i>	Hemolysin

RISULTATI

I risultati della sierotipizzazione dei ceppi di *Escherichia coli* oggetto del presente studio sono riportati in tabella 2. Numerosi ceppi sottoposti allo studio (35/50) non risultano appartenere ai sierogruppi testati e rappresentativi dei più comuni sierotipi noti di *E.coli*. Tra quelli identificati, il sierotipo O2 è risultato il più frequente. Per quanto riguarda il profilo di antimicrobico-resistenza, in *Figura 1*, è riportato un grafico con le percentuali di resistenze evidenziate nei 50 ceppi analizzati mediante la determinazione della MIC. Tetraciclina e ampicillina sono gli antibiotici che mostrano la maggiore resistenza, mentre la flumequina mostra un alto livello di ceppi (30%) con valori intermedi.

Le analisi eseguite per rilevare i fattori di virulenza, riportate in *figura 2*, mostrano la prevalenza con cui questi sono presenti, ed è espressa in percentuale per i geni identificati. I sistemi di acquisizione del ferro (*sitA*, *iutA*, *irp2*, *ironN*), le protezioni/resistenza al siero (*iss*, *cvi/cva*) e i geni strutturali/enzimi (*ompT*, *hlyF*) sono estremamente conservati nella popolazione batterica analizzata (tutti sopra l'80%), mostrano quindi un'alta prevalenza. Più basse, invece, le percentuali dei geni delle tossine (*vat*, *EAST1*) e delle adesine (*tsh*, *papC*, *F11*), presenti con una prevalenza minore. Nella tabella 3 sono riportati i fattori di virulenza in funzione del sierotipo

Tabella 2: Sierotipizzazione degli APEC (suddivisi per categoria produttiva).

Sierogruppo	Ovaiole (n=26)	Riproduttori (n=24)	Totale (N=50)
O:2	2	5	7
O:8	1	0	1
O:9	0	1	1
O:18	1	0	1
O:20	0	1	1
O:64	1	0	1
O:86	1	0	1
O:88	1	0	1
O:149	0	1	1
ND	19	16	35
TOTALE	26	24	50

ND = non determinabile

Tabella 3: fattori di virulenza associati al sierotipo.

Sierogruppo	Fattori di Virulenza
O:2	F11, papC, tsh, EAST1 (astA), vat, ibeA, iucD, irp2, ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF
O:8	ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF
O:9	irp2, ironN
O:18	tsh, vat, iucD, irp2, ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF
O:20	tsh, EAST1 (astA), iucD, irp2, ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF
O:64	cvi/cva, iss, hlyF
O:86	tsh, EAST1 (astA), iucD, irp2, ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF
O:88	tsh, iucD, irp2, ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF
O:149	sitA
ND	F11, papC, tsh, vat, iucD, irp2, ironN, iutA, sitA, cvi/cva, iss, ompT, hlyF

Figura 1: Profili di Antimicrobico-Resistenza (AMR).

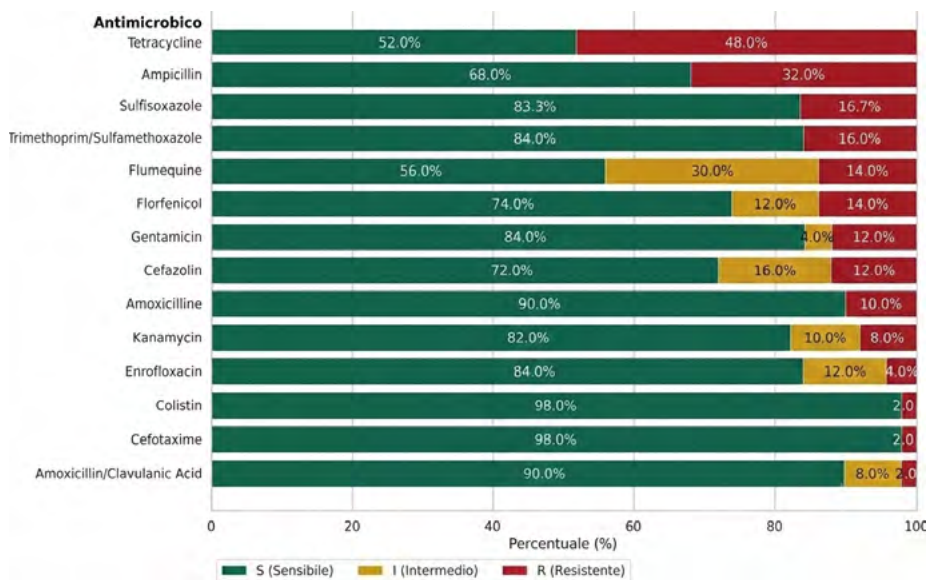
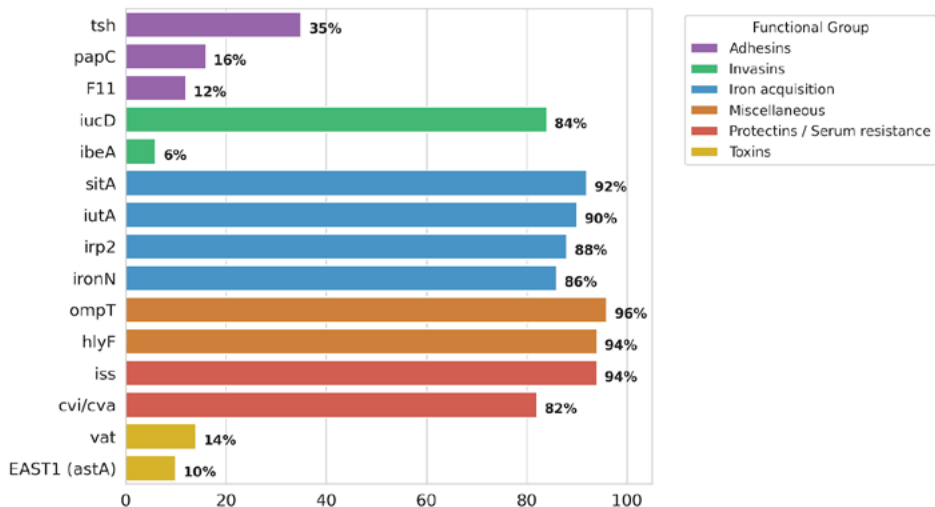


Figura 2: prevalenza dei fattori di virulenza analizzati sui 50 ceppi di APEC oggetto dello studio.



DISCUSSIONE

Scopo del presente studio era fornire dati aggiornati sulle caratteristiche antigeniche, di virulenza e di antimicrobico-resistenza dei ceppi di APEC circolanti nel territorio nazionale nei settori delle galline ovaiole da consumo e dei riproduttori pesanti in fase di deposizione. I risultati dell'indagine hanno messo in evidenza un elevato numero di ceppi di APEC non appartenenti al pannello di antisieri utilizzato nello studio (comprendente 30 diversi sierotipi). In proiezione futura questa indagine andrebbe pertanto implementata includendo altri sierotipi (come ad esempio il sierotipo O145, descritto come emergente in alcuni paesi); l'integrazione della caratterizzazione genotipica a quella antigenica si dimostra promettente al fine di mappare accuratamente il potenziale patogeno dei ceppi APEC circolanti negli allevamenti. La netta prevalenza (riscontrata nel presente studio) di fattori di virulenza associati all'acquisizione del ferro (*sitA*, *iutA*, *irp2*, *iroN*), alla resistenza al siero (*iss*, *cvi/cva*) e a determinanti strutturali/enzimatici (*ompT*, *hlyF*) conferma l'elevata attitudine invasiva e la capacità di diffusione sistemica degli isolati raccolti nel primo semestre del 2026. Il significato patogeno dei fattori di virulenza degli APEC non è ancora consolidato, al contrario di altre specie di interesse zootecnico (suino, bovino). Tuttavia, la caratterizzazione molecolare offre un promettente strumento per scopi epidemiologici e diagnostici. Tale metodica consente inoltre di superare il modello animale nello studio della patogenicità dei ceppi di APEC (Ask et al., 2006).

Sul fronte dell'antibiotico-resistenza (AMR), il profilo emerso delinea trend evolutivi significativi se confrontati con la letteratura scientifica attualmente disponibile. La resistenza alla tetraciclina mostra un trend in aumento, raggiungendo il 48% rispetto al 43% riportato in letteratura. Al contrario, per l'ampicillina si osserva un trend in diminuzione, con una prevalenza del 32% contro il 45%. Il monitoraggio continuo della AMR rimane cruciale nel settore avicolo nonostante la drastica riduzione delle opzioni terapeutiche disponibili, soprattutto nel settore delle galline ovaiole da consumo e dei riproduttori in fase di deposizione. Data la consolidata evidenza scientifica sul potenziale zoonotico di alcuni cloni di APEC dovuta alle strette correlazioni genomiche con i ceppi umani (*ExPEC*), valutare l'AMR di questi isolati verso le diverse classi antibiotiche è di fondamentale importanza. Pertanto, monitorare l'eventuale acquisizione di ulteriori resistenze e limitare il rischio di trasmissione dei fattori di resistenza e patogenicità è indispensabile non solo per preservare l'efficacia dei trattamenti in medicina veterinaria, ma anche per arginare il potenziale rischio zoonotico in ottica *One Health*. La vaccinazione nei confronti degli APEC rappresenta una valida e promettente strategia di controllo della malattia. Attualmente l'unico vaccino registrato nel nostro paese è allestito con un ceppo deleto di *E.coli* appartenente al sierotipo O78. Uno dei limiti principali della vaccinazione nei confronti degli APEC è rappresentato dalla protezione sierotipo-specifica (anche se per il ceppo vaccinale attualmente disponibile è descritta una protezione crociata in grado di ridurre l'incidenza e la gravità delle aerosacculiti causate dai sierotipi O1, O2 e O18 in caso di somministrazione spray). La vaccinazione con il ceppo deleto O78 potrebbe essere potenziata ed implementata dall'allestimento di autovaccini allestiti con i ceppi di APEC isolati in fase di deposizione e somministrati, sottoforma di vaccini inattivati, in fase di pollastra. L'efficacia degli autovaccini è condizionata dalla scelta dei ceppi di APEC con i quali allestire il vaccino. È innanzitutto necessario non fermarsi ad un unico isolamento di APEC, ma eseguire ripetuti campionamenti in fase di deposizione dai quali isolare, dagli organi sede di lesione, numerosi ceppi di *Escherichia coli* sui quali condurre prove di sierotipizzazione e di studio dei fattori di virulenza mediante metodiche molecolari. Tutto questo con lo scopo di disporre di una "rosa" di ceppi di APEC dai quali scegliere quelli maggiormente indicati per l'allestimento degli autovaccini, combinando le caratteristiche antigeniche (sierotipo) con quelle di virulenza.

CONCLUSIONI

La colibacillosi aviaria rappresenta la principale causa di mortalità e di perdite economiche del settore avicolo, in ogni categoria produttiva. Il ruolo di *Escherichia coli* come agente patogeno primario è tuttora controverso; in generale la colibacillosi è considerata una patologia favorita da una serie di fattori predisponenti di natura ambientale, manageriale e infettiva. Il controllo di questi fattori resta perciò di primaria importanza. La riduzione dell'impiego degli antibiotici limita notevolmente le opzioni terapeutiche, soprattutto nei gruppi in fase di deposizione. La vaccinazione rappresenta una strategia percorribile. I risultati del presente studio hanno infatti evidenziato come possano essere isolati, da casi conclamati di colibacillosi, ceppi non appartenenti ai più comuni sierotipi di *E.coli*, ma che presentano geni codificanti per uno o più fattori di virulenza. In conclusione, lo studio combinato delle caratteristiche antigeniche e di virulenza dei ceppi di *E.coli* isolati in corso di colibacillosi potrebbe rientrare nei protocolli diagnostici routinari, in quanto in grado di fornire informazioni preziose dal punto di vista diagnostico ed epidemiologico e consentire nello stesso tempo un corretto approccio all'allestimento degli autovaccini, qualora si intendesse intraprendere questa strategia di controllo, complementare all'impiego del vaccino vivo delevato attualmente disponibile e senza abbassare il livello di attenzione nei confronti della profilassi diretta, della biosicurezza e del controllo dei fattori predisponenti di natura ambientale e infettiva (virus respiratori e micoplasmi). Parallelamente, il monitoraggio costante dell'AMR si conferma una priorità assoluta, non solo per preservare l'efficacia dei trattamenti di campo, ma anche in ottica *One Health*, al fine di valutare e scongiurare il potenziale rischio zoonotico correlato agli APEC.

BIBLIOGRAFIA

1. Ask B., Van der Waaij E.H., Van Eck J.H.H., Van Arendonk A.M., Stegeman J.A. (2006). Defining susceptibility of broiler chicks to colibacillosis. *Avian Pathology* 35 (2): 147-153.
2. Gambi L., Rossin R., Menandro M.L., Franzo G., Valentini F., Tosi G., D'Incau M., Fiorentini L. (2022). Virulence factors and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolated from laying hens in Italy. *Animals* 12:1812.
3. Kunert Filho H.C., Carvalho D., Grassotti T.T., Soares B.d., Rossato J.M., Cunha A.C., Brito K.C.T., Cavalli L.S., Brito B.G. (2015). Avian Pathogenic *Escherichia coli* – methods for improved diagnosis. *World's Poultry Science Journal* 71:249-258.
4. Markland S.M., LeStrange K.J., Sharma M., Kniel K.E. (2015). Old friends in new places: exploring the role of extraintestinal *E.coli* intestinal disease and foodborne illness. *Zoonoses and public health* 62:491-496.
5. Mellata M. (2013). Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease* 10: 916-932.
6. Nawaz S., Wang Z., Zhang Y., Jia Y., Jang W., Chen Z., Yin H., Huang C., Han X. (2024). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): current insights and future challenges. *Poultry Science* 103:104359.

DISSEMINAZIONE AMBIENTALE DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA NEL NORD DELL'ALGERIA: EVIDENZE DALLA FAUNA SELVATICA COME BIOINDICATORE

Esposito E.¹, Chabani S.², Rezouani I. E.³, Dilmi S.², Scarpellini R.¹, Mondo E.¹, Ivanova M.⁴, Otani S.⁴, Scaravelli D.¹, Bakhouch B.², Piva S.¹

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

² *Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, BP 32, 16111, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria;*

³ *École Normale Supérieure Cheikh Mohamed Bachir el Ibrahimy – Kouba, BP 92, 6050 Algiers, Algeria;*

⁴ *Research Group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, Kgs Lyngby, Denmark.*

Summary

Antimicrobial resistance (AMR) is a major One Health challenge, with the environment playing a key role in the dissemination of resistant bacteria. Wildlife, not conventionally exposed to antimicrobials, may act as potential bioindicator of AMR at the human–animal–environment interface. This study evaluated the role of wild birds and freshwater turtles as a bioindicator of environmental AMR in Northern Algeria by analysing AMR pattern in coliform bacteria through phenotypic and genomic approaches. Cloacal swabs were collected from 60 animals (51 birds, 9 reptiles) across three distinct ecological sites (Annaba, Algiers, Reghaïa) between May and June 2025. Coliforms were identified by MALDI-TOF MS and tested by disk diffusion; classifying isolates as wild-type (WT) or non-wild-type (NWT) using EUCAST epidemiological cut-off values (ECOFFs). Non-wild-type (NWT) isolates underwent whole-genome sequencing using Oxford Nanopore Technologies. Of 99 coliforms, 33.33% were NWT, mainly against ampicillin (38.78%), tetracycline (33.33%) and trimethoprim–sulfamethoxazole (19.19%); with distinct resistance profiles among sampling sites. Whole-genome sequencing of NWT isolates identified acquired resistance determinants in 76.67% of sequenced isolates and revealed clinically relevant genes including plasmid-mediated *mcr-1.1* (IncI2) in gulls from Algiers and *blaCTX-M-15* in a turtle from Reghaïa. Notably, the internationally recognised high-risk clone ST410 was also detected. The occurrence of antimicrobial resistance and clinically important resistance genes in wildlife, with no history of direct antimicrobial exposure, points to environmental contamination and the dissemination of resistant bacteria in Northern Algeria, and highlights the value of wild animals as valuable bioindicators of environmental AMR within One Health surveillance frameworks.

INTRODUZIONE

La resistenza antimicrobica (AMR) rappresenta una delle principali minacce globali per la salute pubblica e, per la sua natura multifattoriale, richiede strategie integrate coerenti con l'approccio One Health, che riconosce l'interconnessione tra salute umana, animale e ambientale. L'ambiente svolge un ruolo chiave come serbatoio e veicolo di batteri resistenti e geni di resistenza (ARG), ma rimane una componente ancora poco esplorata. La fauna selvatica, non essendo sottoposta a trattamenti antimicrobici diretti, può essere impiegata come bioindicatore della contaminazione ambientale da AMR: il loro microbiota commensale può riflettere l'esposizione cumulativa alle pressioni antropiche degli ecosistemi in cui vivono

(Torres et al., 2020; Esposito et al., 2024). Lo scopo del presente studio è stato valutare i profili di AMR in batteri coliformi isolati da uccelli selvatici e rettili in tre aree ecologicamente distinte dell'Algeria settentrionale (Algeri, Annaba e lago di Reghaïa), combinando analisi fenotipiche (Kirby-Bauer) con il sequenziamento dell'intero genoma (WGS), ai fini di investigare il loro ruolo come bioindicatori della contaminazione ambientale da AMR.

MATERIALI E METODI

Aree di studio e campionamento

Lo studio è stato condotto tra maggio e giugno 2025 in tre aree dell'Algeria settentrionale con differenti caratteristiche ambientali e antropiche: Annaba, area costiera dell'Algeria orientale caratterizzata dalla compresenza di contesti urbani, agricoli e attività zootecniche; Algeri, rappresentativa di un contesto fortemente urbanizzato; e Reghaïa, riserva naturale dall'alto valore ecologico. Sono stati campionati, attraverso l'esecuzione di un tampone cloacale (Copan ESwab®), uccelli selvatici e tartarughe (*Mauremys leprosa*); gli uccelli sono stati campionati in tutte le aree, i rettili esclusivamente a Reghaïa. I campioni sono stati conservati a 4 °C e spediti presso il laboratorio di batteriologia veterinaria (VeLaBac) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

Isolamento e identificazione batterica

I tamponi sono stati sottoposti a pre-arricchimento in Buffered Peptone Water e successivo arricchimento selettivo in EC broth per favorire la crescita dei coliformi. L'isolamento è stato effettuato su terreno cromogeno (CHROMagar™ Orientation) e l'identificazione batterica mediante spettrometria di massa MALDI-TOF MS (Bruker).

Test di sensibilità antimicrobica

La sensibilità agli antimicrobici è stata valutata con il metodo di diffusione in agar (Kirby-Bauer) secondo linee guida EUCAST verso 8 molecole (gentamicina, ampicillina, amoxicillina-acido clavulanico, ceftiofur, tetraciclina, enrofloxacin, trimethoprim-sulfametossazolo, ertapenem). Gli isolati sono stati classificati come wild-type (WT) o non-wild-type (NWT) utilizzando i cut-off epidemiologici (ECOFF) EUCAST; in assenza di ECOFF, l'assenza di alone di inibizione è stata considerata indicativa di resistenza fenotipica. Le resistenze intrinseche sono state escluse dalla valutazione.

Sequenziamento e analisi bioinformatica

Gli isolati NWT sono stati sottoposti a sequenziamento dell'intero genoma (WGS) mediante tecnologia Oxford Nanopore Technologies presso la Technical University of Denmark (DTU). Dopo assemblaggio *de novo* (Flye) e controllo qualità delle sequenze (CheckM), l'identificazione di specie è stata confermata mediante KmerFinder e ANIb. Sono stati determinati il sequence type (MLST), i patotipi e i serotipi (ECTyper), i fattori di virulenza (VFDB), i geni di resistenza acquisita (ResFinder), le mutazioni cromosomiche (PointFinder) e i repliconi plasmidici (PlasmidFinder).

Analisi statistica

Le associazioni tra caratteristiche degli ospiti animali, area di campionamento e profili di resistenza (fenotipo/genotipo) sono state valutate mediante regressione lineare e test esatto di Fisher con correzione per confronti multipli mediante Benjamini-Hochberg, considerando significativo un valore corretto $p(q) \leq 0,05$.

RISULTATI

Sono stati campionati un totale di 60 animali (51 uccelli selvatici e 9 rettili), dai quali sono stati isolati complessivamente 99 coliformi (78.8% da uccelli e il 21.2% da rettili). *Escherichia coli* è risultata la specie predominante (47/99; 47.5%), seguita da *Citrobacter* spp. ed *Enterobacter* spp. Il 33.33% (33/99) degli isolati è stato classificato come NWT, con proporzioni più elevate verso ampicillina (38.78%), tetraciclina (33.33%) e trimethoprim-sulfametossazolo (19.19%). La proporzione di NWT è stata del 35.90% negli uccelli e del 23.81% nei rettili. Sono emersi pattern di resistenza differenti tra le aree di campionamento: ad Annaba è stata osservata una maggiore frequenza di NWT verso tetraciclina (44.44%), ad Algeri verso ampicillina (42.86%) ed enrofloxacin (8.70%), mentre a Reghaïa verso ampicillina (40.74%). È emersa un'associazione statisticamente significativa ad Annaba tra uccelli stanziali e fenotipo NWT alla tetraciclina ($p = 0,043$; OR = 15). Gli isolati NWT sono stati sottoposti a WGS: 30 genomi (24 da uccelli, 6 da rettili) hanno superato i criteri di qualità e selezionati per le successive analisi. L'MLST ha assegnato il 60% dei genomi a 14 sequence type (il più frequente ST10, $n = 4$), evidenziando anche la presenza del clone internazionale ad alto rischio ST410. Fattori di virulenza sono stati rilevati in 26/30 genomi. Geni di resistenza acquisiti sono stati individuati nel 76.67% dei genomi (23/30), con prevalenza dei determinanti nei confronti di classi come: tetraciclina (66.67%), β -lattamici e antagonisti del folato (50.0% ciascuno), aminoglicosidi (46.67%) e chinoloni (36.67%); i geni più frequenti sono stati *tet(A)*, *bla*TEM-1B, *qnrS1* e *dfrA14*. Mutazioni cromosomiche puntiformi sono state rilevate in 7/30 genomi, prevalentemente *gyrA* S83L. Il replicone plasmidico predominante è risultato IncF (56.67%). Tra i determinanti genici di maggior rilievo sono stati identificati il gene *mcr-1.1*, associato a resistenza alla colistina, su plasmide IncI2 in due *E. coli* isolati ad Algeri e l'unico gene ESBL *bla*CTX-M-15 in un rettile a Reghaïa. A livello genomico non sono emerse differenze statisticamente significative tra ospiti o aree, coerentemente con il limitato numero di genomi.

DISCUSSIONE

Questo studio fornisce evidenze sul ruolo di uccelli selvatici e rettili come bioindicatori di AMR ambientale in Algeria. La predominanza di *E. coli* e degli altri coliformi è coerente con il microbiota intestinale degli ospiti campionati e consolida l'impiego dei coliformi come indicatori di AMR ambientale (Anjum et al., 2021). I profili fenotipici e genomici hanno mostrato concordanza: le classi più rappresentate (tetraciclina, β -lattamici, antagonisti del folato) erano sostenute da geni ampiamente diffusi (*tet(A)*, *bla*TEM-1B, *qnrS1*, *sul/dfr*), tipicamente associati a pressione selettiva antropica. Le differenze osservate tra le aree investigate suggeriscono la presenza di pressioni selettive antropiche differenti: l'elevata percentuale di NWT alla tetraciclina ad Annaba è compatibile con l'uso di questa molecola in zootecnia, mentre Algeri, area fortemente urbanizzata, ha mostrato il resistoma più ampio, comprendente determinanti clinicamente rilevanti (*fosA4*, *mcr-1.1*). A Reghaïa, zona umida protetta ma fortemente inquinata, è emersa la presenza di un gene ESBL, quale *bla*CTX-M-15 in una tartaruga, in linea con i livelli di resistenza già descritti per quest'area (Alouache et al., 2012) e con il ruolo emergente di tartarughe d'acqua come sentinelle di AMR (Mengistu et al., 2022). La maggiore prevalenza di NWT negli uccelli stanziali rispetto ai migratori supporta l'ipotesi che le specie residenti rispecchino meglio le pressioni antimicrobiche locali. I determinanti genici *mcr-1.1* e *bla*CTX-M-15 emersi con il WGS evidenziano il valore aggiunto dell'integrazione del WGS nella sorveglianza ambientale dell'AMR. Tra i limiti vanno considerati la ridotta numerosità campionaria, in particolare per i rettili, e l'esecuzione del WGS limitata agli isolati con fenotipo NWT.

CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia la presenza diffusa di batteri coliformi con profili di resistenza antimicrobica nella fauna selvatica dell'Algeria settentrionale, con pattern sito-specifici coerenti con le pressioni antimicrobiche locali. A livello genomico, i determinanti di resistenza acquisita, suggeriscono che i coliformi della fauna selvatica possono riflettere la presenza ambientale di geni di resistenza veicolati dalle pressioni antropiche. Nel complesso, questi risultati rafforzano il potenziale impiego della fauna selvatica come bioindicatore della diffusione ambientale dell'AMR e supportano la loro integrazione in strategie di sorveglianza della diffusione di AMR in ottica One Health.

BIBLIOGRAFIA

1. Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C and R Bakour. (2012). Antibiotic resistance and extended-spectrum β -lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microbes Environ.* 27: 80-86.
2. Anjum MF, Schmitt H, Börjesson S, et al. (2021). The potential of using *Escherichia coli* as an indicator for the surveillance of antimicrobial resistance (AMR) in the environment. *Curr. Opin. Microbiol.* 64: 152-158.
3. Esposito E, Scarpellini R, Celli G, Marliani G, Zaghini A, Mondo E, Rossi G and S Piva. (2024). Wild birds as potential bioindicators of environmental antimicrobial resistance: a preliminary investigation. *Res. Vet. Sci.* 180: 105424.
4. Mengistu TS, Garcias B, Castellanos G, Seminati C, Molina-López RA and L Darwich. (2022). Occurrence of multidrug resistant Gram-negative bacteria and resistance genes in semi-aquatic wildlife as sentinels of environmental health. *Sci. Total Environ.* 830: 154814.
5. Torres RT, Carvalho J, Cunha MV, Serrano E, Palmeira JD and C Fonseca. (2020). Temporal and geographical research trends of antimicrobial resistance in wildlife: a bibliometric analysis. *One Health* 11: 100198.

EVOLUZIONE DELLA BIOSICUREZZA AVICOLA: INDAGINE CONOSCITIVA IN UN TERRITORIO DELLA REGIONE LOMBARDIA NEGLI ANNI 2017-2025

Felice V.¹, Locatelli E.², Alloni M.¹, Sorice A.¹, Grilli G.²

¹*Dipartimento Veterinario e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, ATS Bergamo, Via Borgo Palazzo 130, 24125 Bergamo (BG), Italia;*

²*Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Via dell'Università 6, 26900 Lodi (LO), Italia.*

Summary

Over the years, the regulatory framework governing poultry biosecurity has become progressively more stringent, in response to the changing epidemiological scenario linked to outbreaks of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI), placing increasing demands for adaptation on both the production sector and the Veterinary Services. This process has been further complicated by the transformation of the poultry sector itself, with the emergence of small mountain enterprises and the spread of family-run (rural) holdings, which represent potential risk factors for the entire production system. The present study proposes a retrospective epidemiological analysis aimed at evaluating the temporal evolution of biosecurity levels in 134 poultry farms located in an area of the province of Bergamo, over the period 2017-2025, divided into four production sectors: meat poultry, layers, rearing farms and rural holdings. Compliance percentages for individual items on the official ministerial checklists were analysed using the tenth percentile (P10), employed as a dynamic critical threshold to identify, year by year, the 10% least-performing items, with a further distinction drawn between external and internal biosecurity measures. Results for the industrial sector show a progressive decline in the provincial P10 from 100% (2017) to 33.33% (2021-2024), which should not be interpreted as an actual deterioration in the field but rather as a “screening effect” linked to the expansion of the checklists (from 29 to 59 items), followed by a recovery to 50% in 2025. External biosecurity proved to be systematically more critical than internal biosecurity across all sectors, with predominantly structural weaknesses (proximity to water sources, natural ventilation, vehicle access) accompanied, in more recent years, by internal management shortcomings. The rearing sector emerged as the most vulnerable, with the P10 collapsing to 6.67% in 2025. The rural sector, assessed using a constant number of items over time, displayed a “bell-shaped” trend, with a marked improvement in 2021-2022 followed by a worrying decline in 2025. The study confirms the overall soundness of the biosecurity level achieved, while also highlighting how the P10 indicator represents an original and effective tool to support Veterinary Public Health, capable of isolating relative vulnerabilities even where absolute compliance levels are high. Future improvements in poultry biosecurity will depend not solely on the introduction of new regulatory requirements, but above all on the structural upgrading of farms, the strengthening of operator training, and the maintenance of continuous epidemiological surveillance, within an approach to biosecurity understood as a dynamic process rather than a static set of requirements.

INTRODUZIONE

Nel corso degli anni, gli item delle check list per la verifica dei requisiti della biosicurezza, hanno subito profonde modifiche, riflettendo l'evoluzione del quadro epidemiologico in relazione ai focolai di Influenza Aviaria ad Alta Patogenicità (HPAI). Di conseguenza, sia il settore produttivo sia i Servizi Veterinari hanno profuso notevoli sforzi per adempiere a un quadro normativo in costante mutamento. Tale adeguamento risulta complesso non solo per l'entità degli investimenti economici richiesti dalle modifiche strutturali, ma anche per le trasformazioni del

settore avicolo. Si assiste, infatti, alla nascita di numerose piccole realtà di montagna destinate alla vendita locale di uova con un numero esiguo di capi. Parallelamente, si registra una diffusione crescente degli allevamenti familiari (rurali) che, sebbene trattasi di realtà più semplici, possono rappresentare un concreto fattore di rischio per l'intero settore produttivo.

Infine, queste aziende incontrano maggiori difficoltà nel soddisfare determinati requisiti.

Il presente lavoro si propone di analizzare in modo sistematico da un lato la progressiva evoluzione sempre più stringente della normativa e dall'altro gli sforzi di adeguamento messi in atto dal settore.

L'obiettivo dello studio è condurre un'analisi epidemiologica retrospettiva volta a valutare l'evoluzione temporale dei livelli di biosicurezza negli allevamenti avicoli ubicati in un'area della provincia di Bergamo, nel periodo compreso tra il 2017 e il 2025.

L'indagine è stata inoltre orientata a identificare le variazioni della conformità in relazione all'evoluzione del quadro normativo di riferimento, valutando l'influenza esercitata da fattori gestionali ed epidemiologici potenzialmente associati all'implementazione e al mantenimento delle misure di biosicurezza aziendale.

Attraverso l'applicazione dell'indicatore statistico del decimo percentile (P10) ai singoli item delle check-list ministeriali impiegate nell'ambito delle attività, lo studio si propone di monitorare nel tempo la soglia critica di conformità alle misure di biosicurezza previste dalla normativa vigente nelle diverse tipologie produttive del comparto avicolo, includendo allevamenti di polli da carne, galline ovaiole, svezamento e rurali.

MATERIALI E METODI

I dati sono stati raccolti da allevamenti avicoli localizzati in un'area della provincia di Bergamo. Sono stati analizzati in totale 134 allevamenti di diversi orientamenti produttivi in 7 anni (tabella n.1). I dati relativi alle annualità 2019 e 2020 non sono stati inclusi nel presente studio a causa dell'incompletezza delle registrazioni storiche d'archivio.

Visto il numero esiguo di allevamenti di alcuni orientamenti produttivi e/o la similitudine delle check-list, si è provveduto al seguente raggruppamento:

- Allevamenti di broiler, quaglie e tacchini da carne, sono stati raggruppati sotto la voce pollame da carne;
- Allevamenti rurali, di avicoli ornamentali e selvaggina, sono stati raggruppati sotto la voce rurali.

Tabella 1. Numero allevamenti avicoli analizzati nel periodo 2017-2025 con raggruppamento delle tipologie produttive.

ANNI		2017	2018	2021	2022	2023	2024	2025
TIPOLOGIA PRODUTTIVA	Pollame da carne (broiler, quaglie e tacchini da carne)	4	5	4	5	5	7	2
	Ovaiole	2	2	3	4	3	3	4
	Svezamento	6	5	3	4	3	3	2
	Rurale (rurali, avicoli ornamentali e selvaggina)	6	6	6	7	6	12	12
TOTALE ALLEVAMENTI PER ANNO		18	18	16	20	17	25	20

Check-list biosicurezza

Le check-list ministeriali per la valutazione della biosicurezza sono soggette ad aggiornamenti con frequenza variabile. Ad esempio, negli anni 2017 e 2018 è stata utilizzata la medesima check-list per tutte le tipologie produttive considerate. Successivamente, a partire dal 2021, il numero di item previsti per gli allevamenti di pollame da carne, ovaiole e svezzamento ha subito un incremento significativo.

La selezione degli item oggetto di analisi è stata effettuata sulla base della loro comparabilità temporale e della loro rilevanza ai fini della valutazione dei livelli di biosicurezza.

L'unico orientamento produttivo per il quale sono stati considerati tutti gli item presenti nella check-list e il cui numero è rimasto invariato nel tempo è rappresentato dagli allevamenti rurali. All'interno di ogni tipologia produttiva, sono stati considerati i quesiti di biosicurezza esterna e interna, classificati secondo il modello proposto e da Tilli et al., 2022 e da noi modificato.

Per la maggior parte degli item, la modalità di risposta è di tipo dicotomico, prevedendo l'attribuzione di un esito positivo ("Sì") o negativo ("No") in funzione della conformità del requisito valutato. Tali item comprendono sia obblighi normativi, sia raccomandazioni o linee guida finalizzate al miglioramento gestionale. Ad ogni modo, nel presente lavoro si utilizzerà per semplicità la terminologia "conformità/non conformità", estendendola anche alle eventuali inottemperanze a raccomandazioni e/o linee guida.

Alcuni item possono essere considerati sia di biosicurezza esterna che interna, ad es. la "*ventilazione forzata*" è stata classificata come misura di biosicurezza interna in quanto parametro fondamentale per il controllo della sanità della lettiera e della qualità dell'aria, fattori che condizionano direttamente la persistenza e la diffusione di patogeni all'interno dei gruppi accasati. Per quanto concerne il comparto della produzione di uova da consumo, nelle check-list "ovaiole", si è scelto di adottare un approccio analitico aggregato per l'area funzionale relativa alla "*gestione delle uova*". I singoli quesiti della check-list afferenti a questa sezione sono stati raggruppati in un unico indicatore. La conformità di quest'area è stata calcolata come valore medio ponderato delle risposte complessive, focalizzando l'analisi sul livello di biosicurezza globale del processo piuttosto che sui singoli quesiti.

Analisi statistica

Ai fini dell'elaborazione dei dati, le risposte ottenute dai singoli item delle check-list sono state standardizzate affinché valori percentuali più elevati corrispondessero sistematicamente a un maggiore livello di conformità alle misure di biosicurezza. Pertanto, per i pochi item nei quali la risposta affermativa ("Sì") identificava una condizione di non conformità, la percentuale di risposte positive è stata invertita.

Considerato l'elevato livello di conformità riscontrata nel campione oggetto di studio, con percentuali di risposte favorevoli frequentemente superiori al 99%, l'analisi non è stata orientata alla valutazione dei valori medi di conformità, che avrebbero fornito informazioni limitate sulla variabilità nel corso del tempo, ma l'attenzione è stata focalizzata sull'identificazione delle principali aree di miglioramento della biosicurezza (approccio adattato da Tilli et al., 2022).

A tal fine, per ciascun anno di osservazione e per ciascun settore produttivo, è stato utilizzato come valore soglia di criticità il 10° percentile (P10) della distribuzione delle percentuali di conformità di ogni singolo item. Tale parametro è stato utilizzato come soglia di riferimento per individuare gli aspetti più critici, consentendo di isolare il 10% degli item caratterizzati dai livelli di conformità più bassi in quell'anno.

Per ogni settore produttivo (pollame da carne, ovaiole, svezzamento e rurali) sono state raccolte le risposte degli item oggetto di valutazione nei singoli allevamenti. Per ciascun quesito e per ciascun anno, è stata calcolata la percentuale di risposte favorevoli. I dati così ottenuti

sono stati organizzati in quattro tabelle distinte, una per ciascun orientamento produttivo, comprendenti l'intero periodo di studio (2017–2025). A titolo esemplificativo, la tabella n. 2 riporta la tabella dei dati elaborati per il settore degli allevamenti rurali (anni 2017-2018). In un primo step, è stato definito un valore soglia di riferimento a livello d'area di studio, calcolando il P10 annuo sull'intera popolazione dei quesiti di tutti i settori (pollame da carne, ovaiole, svezamento) accorpati in un'unica matrice. Il P10 provinciale così ottenuto rappresenta la soglia di sbarramento utile a isolare il 10% degli item caratterizzati dai livelli di conformità più bassi nell'anno di riferimento. È stata fatta questa scelta per ovviare al numero esiguo di allevamenti per tipologia produttiva. I dati riguardanti gli allevamenti rurali per la peculiarità del settore, sono stati elaborati a parte.

Nel secondo step, la soglia critica del P10 provinciale è stata applicata per l'analisi dei singoli orientamenti produttivi, consentendo di individuare e mappare gli aspetti di biosicurezza più critici all'interno di ciascuno di essi.

Le analisi e i grafici sono stati realizzati utilizzando il software Microsoft Excel® 365.

Tabella 2. Percentuali di conformità negli allevamenti avicoli rurali per ogni item analizzato (con indicata la misura di biosicurezza “esterna”-“interna”) per gli anni 2017-2018. Evidenziati in rosso sono le percentuali inferiori al P10 risultato per quell'anno.

Biosicurezza esterna (E) / interna (I)	Item	2017	2018
I	Pavimento in cemento o in materiale lavabile per facilitare le operazioni di pulizia e disinfezione	NA	100,00%
I	Pareti e soffitti pulibili	NA	100,00%
I	Attrezzature facilmente pulibili e disinfettabili	100,00%	100,00%
E	Adeguate chiusure	100,00%	100,00%
E	Idonee barriere per evitare l'ingresso non controllato di automezzi (cancelli o sbarre mobili)	100,00%	100,00%
E	Idonei strumenti per la pulizia e disinfezione delle strutture di allevamento, delle attrezzature e degli automezzi in ingresso e uscita all'allevamento, delle attrezzature e degli automezzi in ingresso e uscita	100,00%	100,00%
I	Ingressi dei capannoni con piazzole di carico e scarico dei materiali d'uso e degli animali dotate di un solido fondo ben mantenuto, lavabili e disinfettabili e di dimensioni minime pari all'apertura del capannone	NA	NA
E	Caricamento del mangime dall'esterno della recinzione	NA	NA
I	Aree di stoccaggio dei materiali d'uso (lettiere vergini, mezzi meccanici ecc.) protette	100,00%	100,00%
E	Presenza, all'entrata di una zona filtro dotata di spogliatoio, lavandini e detergenti.	100,00%	83,33%
E	Presenza di calzature e tute specifiche per accesso persone	100,00%	100,00%
I	Ogni ambiente di allevamento (svezatori) deve essere delimitato da pareti e dotato di proprio accesso indipendente, anche nel caso confini su uno o più lati con altre unità	100,00%	100,00%

E	Adeguate recinzione	100,00%	100,00%
E	Aree di alimentazione/abbeverata protette	100,00%	100,00%
E	Utilizzo acqua di superficie	50,00%	100,00%
E	Accesso, all'area circostante i capannoni, solo ad automezzi strettamente legati all'attività di allevamento e previa accurata disinfezione;	100,00%	100,00%
I	Esistenza programma aziendale di derattizzazione e di lotta agli insetti nocivi	100,00%	100,00%
E	Presenza dei certificati di avvenuta disinfezione automezzi	NA	NA
I	Uova da consumo: Imballaggi e portauova	83,33%	100,00%
E	Informazioni relative alle movimentazioni corrette e puntuali	NA	NA
E	Presenza registro dei movimenti in ingresso e uscita personale, automezzi ed attrezzature	NA	NA
I	Autocertificazione relativa all'avvenuta pulizia e disinfezione allevamento prima dell'inizio di un nuovo ciclo	NA	NA
I	Rispetto vuoto biologico	NA	50%**
I	Rispetto vuoto sanitario	NA	50%**
E	Carico degli animali morti al di fuori dell'area di allevamento	80% *	16,67%
E	Smaltimento effettuato da ditte autorizzate	80% *	80% *
E	Presenza certificato / documento ritiro animali morti	80% *	80% *
I	Lettiera/pollina stoccata in azienda	100,00%	50,00%
E	Smaltimento effettuato da ditte autorizzate	0,00%	0,00%
Valore P10	P10	66,67%	43,33%

Analisi a confronto sulle misure di biosicurezza esterna/interna

Per ciascun anno di studio e per ciascun orientamento produttivo (broiler, ovaiole e svezamento), è stata determinata la percentuale media degli item critici (punteggio inferiore al P10 provinciale). Gli item identificati come critici sono stati successivamente classificati in funzione della loro appartenenza alle misure di biosicurezza interna o esterna.

In particolare, per ogni anno e settore produttivo, è stata calcolata la proporzione di item critici rispetto al numero complessivo di requisiti valutati all'interno delle due macroaree di biosicurezza. La metodologia di calcolo è riportata nella tabella n.3.

Tabella 3. Percentuale di item critici in funzione della categoria di biosicurezza (esterna o interna).

Carne	Categoria	Numero di item analizzati	Numero item con punteggio basso (<P10)	Percentuale di item critici
2017	Esterna	17	1	= (100 x 1)/17= 5,8%

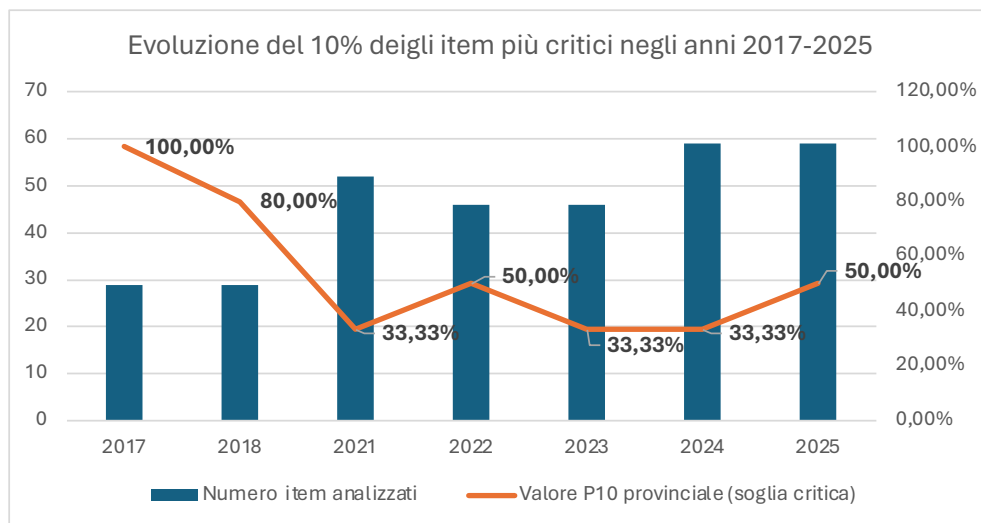
RISULTATI

Evoluzione del benchmark di biosicurezza (p10) negli allevamenti di pollame da carne, ovaiole e svezamento

Sono state analizzate le percentuali di conformità per ogni tipologia di allevamento per anno e si è provveduto all'individuazione del *Benchmark* provinciale P10 annuo, indipendentemente dall'orientamento produttivo, sommando le tre tipologie produttive (Figura 1). L'utilizzo di indicatori percentili come soglie di riferimento dinamiche trova precedenti consolidati in altri ambiti della sorveglianza sanitaria veterinaria, quali i sistemi di benchmarking dell'uso di antimicrobici (Jensen et al., 2014) e le KPI di salute podale bovina (Kofler et al., 2022), da cui il presente studio ha mutuato l'approccio metodologico, introducendo nello specifico l'applicazione del decimo percentile alla valutazione della conformità alle misure di biosicurezza avicola, un ambito in cui - a nostra conoscenza - tale parametro non era ancora stato impiegato.

L'analisi della distribuzione delle conformità nell'area oggetto di studio evidenzia un progressivo peggioramento dello standard minimo di biosicurezza. Come riportato in Figura 1, il valore del decimo percentile, utilizzato come soglia per l'identificazione degli item più critici, è diminuito dal 100% nel 2017 al 50% nel 2025. Ciò indica che nel 2017, a fronte di un numero limitato di quesiti inseriti nella checklist, anche gli item meno performanti registravano il 100% di risposte favorevoli. Nel 2025, invece, a seguito dell'ampliamento del numero di item (59), il 10% dei quesiti più critici ha registrato una percentuale di risposte favorevoli pari o inferiore al 50%. Più che un abbassamento delle performance reali, questo trend evidenzia la maggiore severità e capacità di screening del nuovo sistema di monitoraggio (check-list con maggior numero di item), capace di intercettare vulnerabilità prima non considerate.

Figura 1. Analisi del P10 provinciale dal 2017 al 2025 negli allevamenti di pollame da carne, ovaiole e svezamento.



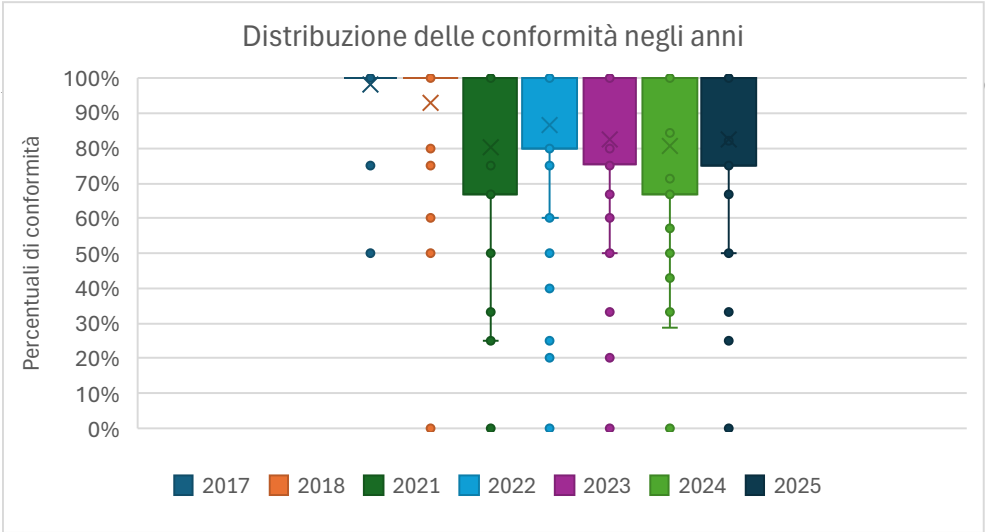
Nei primi due anni di rilevazione, il numero di item analizzati è ridotto (29 item). Il valore del P10 si attesta su livelli molto alti (100,00% nel 2017 e 80,00% nel 2018).

A partire dal 2021 si nota una netta inversione di tendenza. Il numero di item analizzati sale nettamente (n.46 - 59), mentre il P10 crolla bruscamente, pari a 33,33% nel 2021, nel 2023 e nel 2024.

A parità di pressione di controllo (59 item analizzati, il valore massimo nel corso degli anni oggetto di studio), la linea del P10 sale al 50,00%.

Di seguito si riporta la Figura 2 riguardante la distribuzione in percentuale delle conformità negli anni per gli allevamenti pollame da carne, ovaiole e svezamento.

Figura 2. Grafico sulla distribuzione percentuale delle conformità negli anni per gli allevamenti pollame da carne, ovaiole e svezamento.



Utilizzando il P10 provinciale calcolato per anno per ogni orientamento produttivo come parametro di riferimento, è stato possibile mappare le aree di debolezza specifica per ogni settore. In tabella 4 sono riportati i valori di P10 per anno per pollame da carne, ovaiole e svezamento. Infine, sono stati individuati per ogni anno e per categoria i quesiti uguali o inferiori al rispettivo P10 provinciale indicati nelle seguenti Figure 3(a, b, c).

Tabella 4. P10 per anno per orientamento produttivo.

Anno	Pollame da carne	Ovaiole	Svezamento
2017	100%	100%	100%
2018	86%	100%	77%
2021	50%	33,33%	50%
2022	69%	25%	42,50%
2023	56%	33,33%	33,33%
2024	71,43%	33,33%	33,33%
2025	100%	50%	6,67%

Figura 3.a. Item di biosicurezza “critici” rilevati nel pollame da carne.

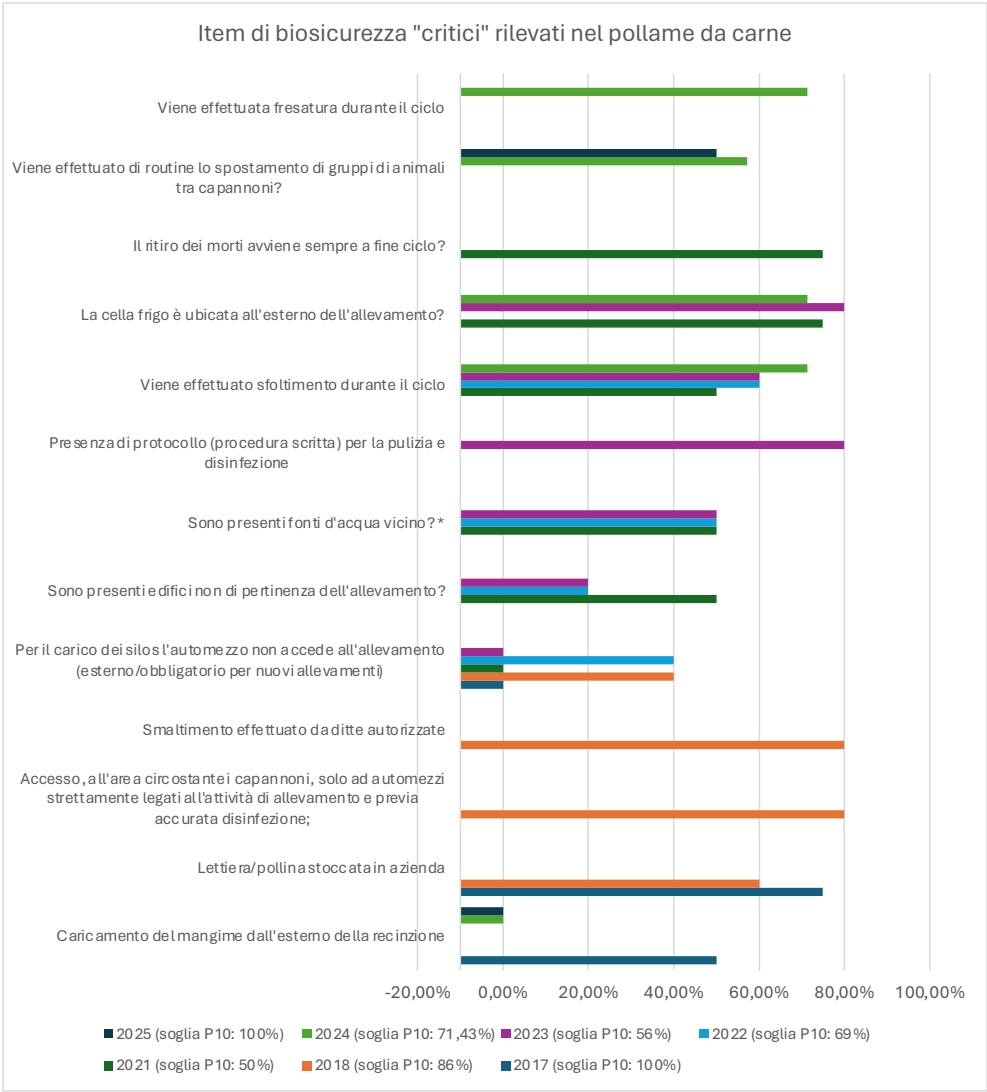


Figura 3.b. Item di biosicurezza “critici” rilevati nelle ovaiole.

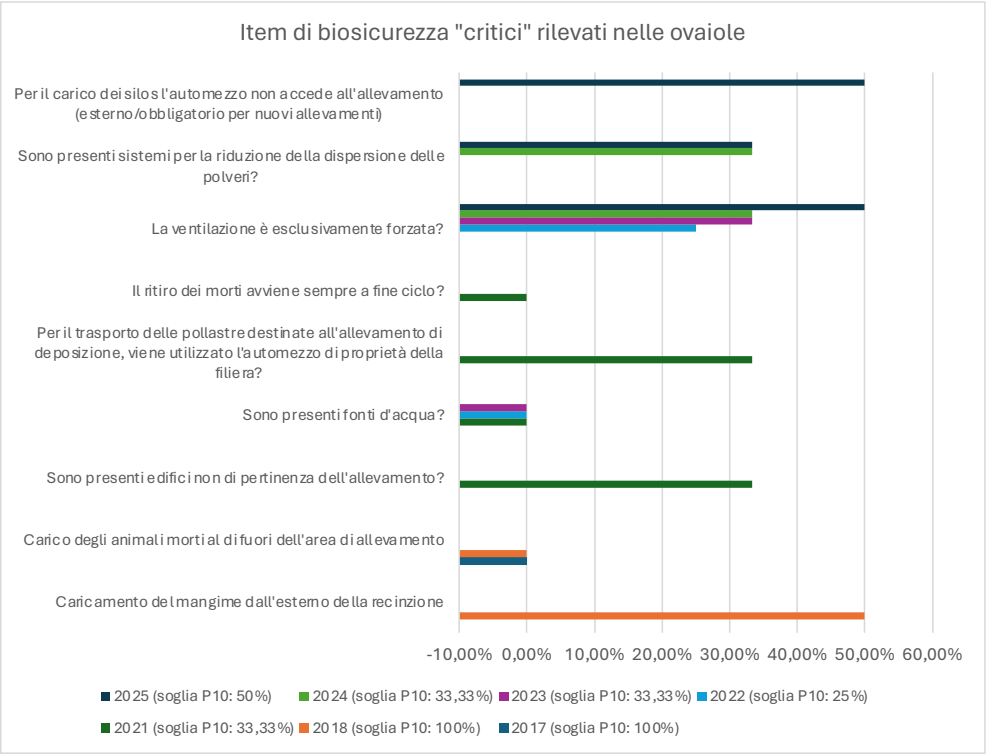
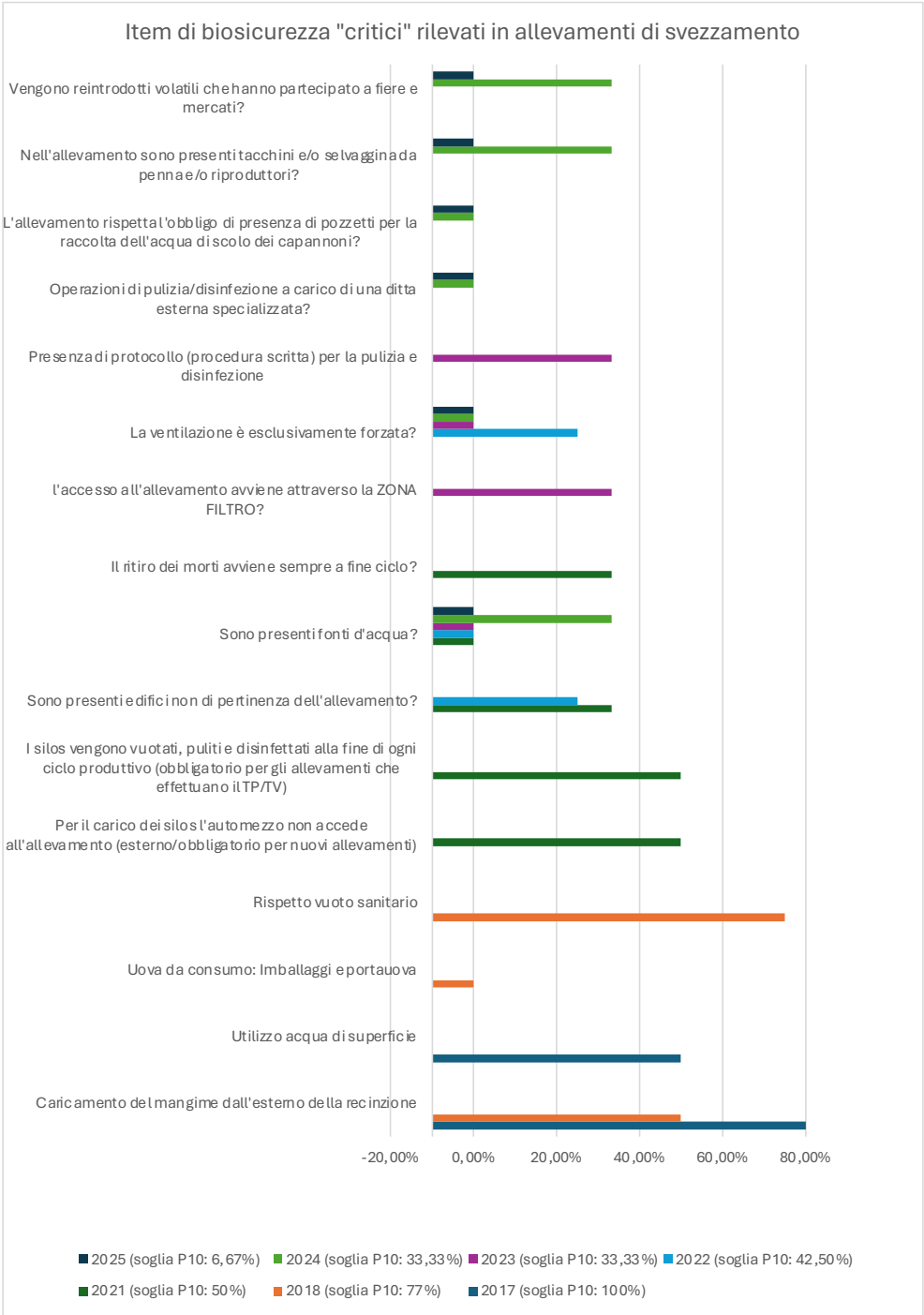


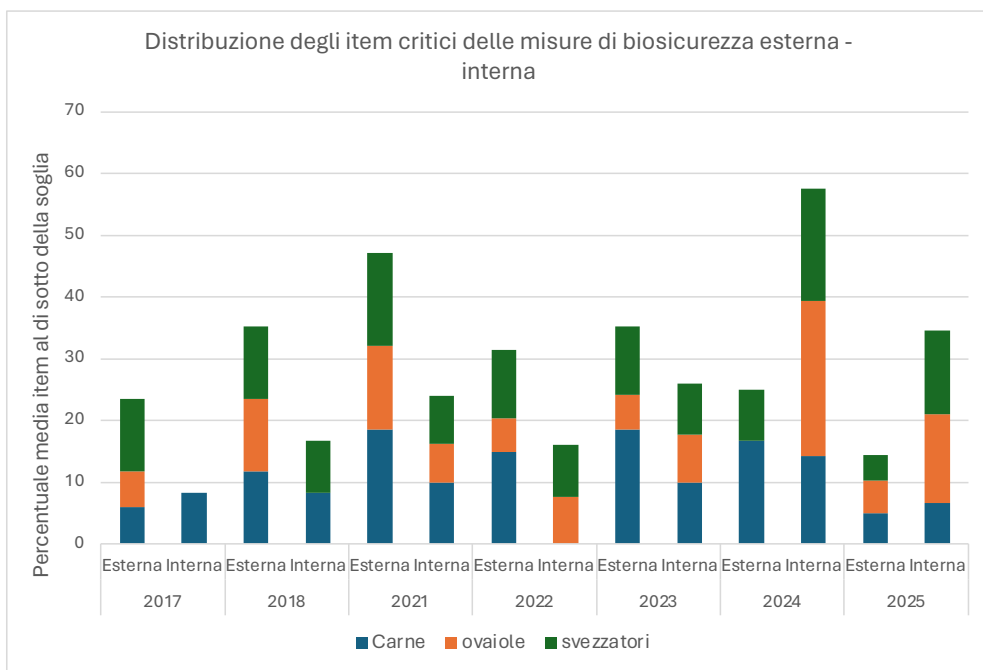
Figura 3.c.. Item di biosicurezza “critici” rilevati in allevamenti di svezzamento.



Confronto dell'andamento delle misure di biosicurezza esterna e interna

Nella seguente Figura 4, viene messo a confronto l'andamento delle misure di biosicurezza esterna con quelle di biosicurezza interna per i vari settori produttivi per anno.

Figura 4. Distribuzione degli item critici delle misure di biosicurezza esterna e quelle di biosicurezza interna per tipologia produttiva per anno.



In linea generale, la biosicurezza esterna presenta picchi significativi, arrivando a superare il 45% di item sotto la soglia nel 2021 e mantenendosi più alta nel 2023 per stabilizzarsi al di sotto del 30% negli anni 2024-2025 a discapito di quella interna. Questo indica che le misure legate ai confini aziendali, alla gestione degli automezzi, alle recinzioni e alle procedure di ingresso (tutto ciò che impedisce ai patogeni di entrare nell'allevamento) rappresentano il punto critico nell'area analizzata ad eccezione degli ultimi due anni di studio.

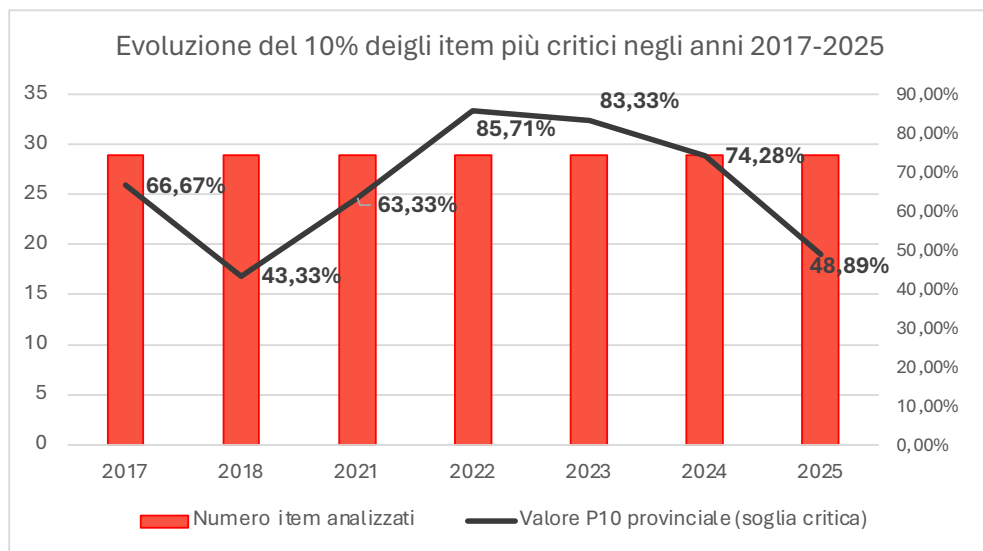
Nel 2024 si registra il picco massimo della biosicurezza interna raggiungendo il punto più alto in assoluto dell'intero periodo di studio. Questo picco è trainato in modo massiccio dal settore delle galline ovaiole (la porzione arancione è larghissima) e dagli svezzatori.

Nel 2025 si osserva un netto miglioramento generale rispetto al 2024. Le criticità esterne quasi si dimezzano, distribuite equamente tra i tre settori, la biosicurezza interna sebbene sia coinvolta da un miglioramento rispetto all'anno precedente raggiunge un picco più alto di quella esterna.

EVOLUZIONE DEL BENCHMARK DI BIOSICUREZZA (P10) NEGLI ALLEVAMENTI RURALI

Sono state analizzate le percentuali di conformità negli allevamenti rurali per anno e si è provveduto all'individuazione del *Benchmark* provinciale P10 annuo (Figura 5).

Figura 5. Analisi del P10 provinciale dal 2017 al 2025 negli allevamenti rurali.



L'analisi della distribuzione delle conformità a livello provinciale, a differenza degli allevamenti industriali analizzati, rappresenta una forma a “campana”, altalenante con tre fasi specifiche:

2017 - 2018 : si parte da un P10 del 66,67% che crolla bruscamente al 43,33% nel 2018, segno di forti criticità iniziali sui quesiti più complessi.

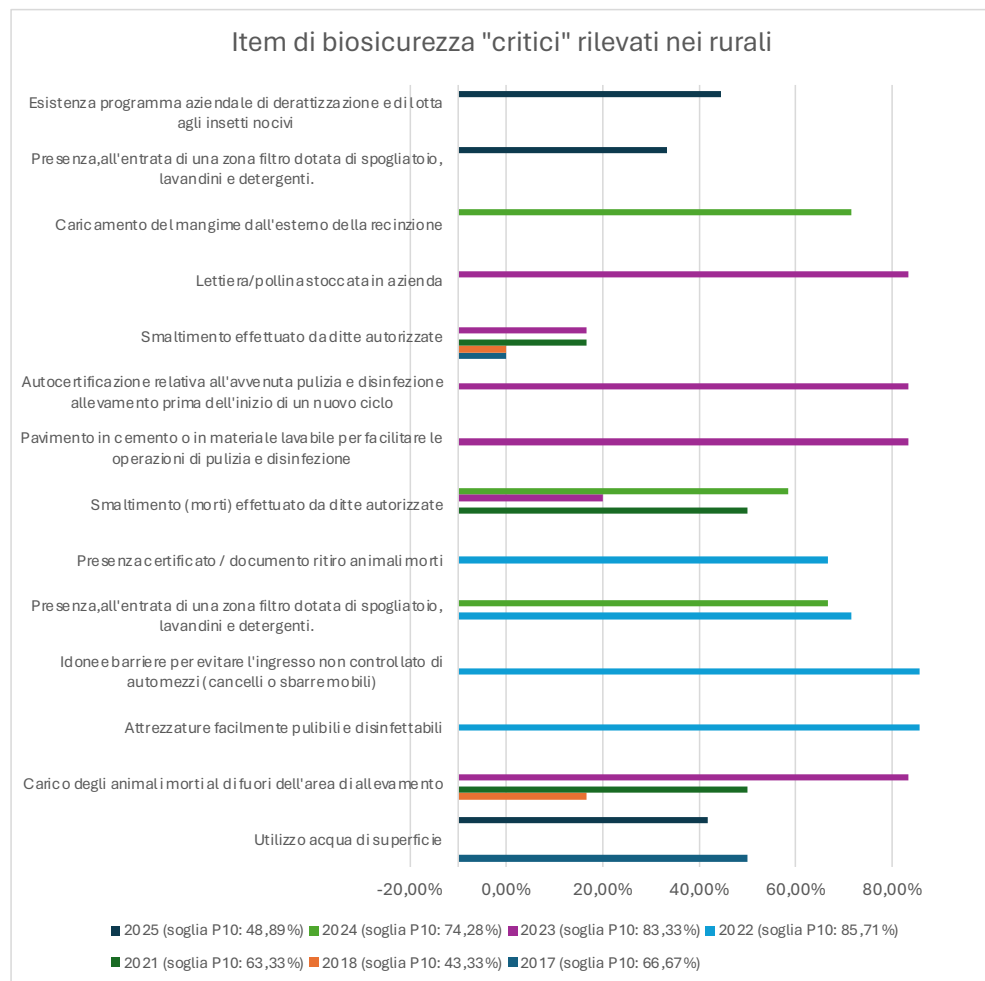
2021 – 2023: si registra un miglioramento eccezionale. Il P10 sale al 63,33% nel 2021 e tocca il suo picco massimo nel 2022 con l'85,71%, mantenendosi altissimo anche nel 2023 (83,33%).

2024 - 2025: Negli ultimi due anni si assiste a una netta e preoccupante inversione di tendenza. Il P10 scende prima al 74,28% nel 2024 e poi precipita al 48,89% nel 2025.

DISTRIBUZIONE DELLE INOSSERVANZE NEL SETTORE RURALE

Utilizzando il P10 provinciale come parametro di riferimento, è stato possibile mappare le aree di debolezza specifica. Sono stati individuati per ogni anno i quesiti uguali o inferiori al P10 provinciale, indicati nella sottostante Figura 6.

Figura 6. Inosservanze nel settore rurale per anno.



Dal grafico si evince che il parametro “*smaltimento tramite ditte autorizzate della pollina*”, “*carico degli animali morti fuori dall’area di allevamento*” e “*smaltimento dei morti*” nel corso degli anni è il requisito meno rispettato, seguito dalla presenza di una zona filtro (2022, 2024).

DICUSSIONE

Come già illustrato nel capitolo dedicato alla biosicurezza, nel corso degli anni il concetto stesso di biosicurezza in ambito avicolo ha subito una significativa evoluzione, con la progressiva introduzione di misure sempre più stringenti e di strumenti di valutazione maggiormente articolati (Dewulf, & Van Immerseel, 2018; Duarte et al., 2025).

In una fase iniziale, l’attenzione era rivolta principalmente alle aree caratterizzate da elevata densità avicola. Successivamente, anche in seguito ai numerosi episodi di influenza aviaria verificatisi sul territorio nazionale, si è assistito a una progressiva riduzione della soglia di tolleranza nei confronti dei fattori di rischio (Tilli et al., 2022). Ciò si riflette in un maggior

numero di item inseriti nelle check-list ministeriali, che proporzionalmente ha fatto sì che in questo lavoro si considerassero dal 2017 al 2025 un maggior numero di quesiti che indagano le misure di biosicurezza (da 29 nel 2017 a 59 nel 2025).

A conferma di questo cambiamento e di aumento di attenzione nei confronti di vari requisiti di biosicurezza, si evidenzia negli anni 2017 - 2018 uno scenario apparentemente ottimale, ma legato a una check-list contenente pochi item, probabilmente concentrati sui requisiti base. Di conseguenza, anche il 10% dei quesiti “più critici” registrava altissimi tassi di conformità negli allevamenti.

Il crollo della linea arancione (Figura 1) a partire dal 2021 non deve essere interpretato come un peggioramento reale sul campo, bensì come un “effetto screening”. L'introduzione di nuovi item nella check-list ministeriale, più specifiche, stringenti e l'anno in questione coincide con un nuovo avvicendamento gestionale dell'area territoriale presa in esame. Questi due aspetti hanno fatto emergere le reali criticità del territorio (con un P10=33,33%). Dopo una lieve ripresa nel 2022 si evidenzia, un ulteriore calo con lo stabilizzarsi di un plateau al 33,33% negli anni 2023 – 2024. Questo andamento coincide temporalmente con l'evoluzione del quadro normativo, in particolare con l'entrata in vigore del Decreto 30 maggio 2023 (Modalità applicative delle misure di biosicurezza negli allevamenti avicoli). Il decreto, infatti entrato in vigore a luglio 2023, concedeva agli operatori 12 mesi per adeguarsi; di conseguenza, l'obbligatorietà delle misure più restrittive è diventata effettiva a partire da luglio 2024, giustificando la persistenza della soglia critica sui livelli minimi.

Nel 2025, a parità di pressione di controllo (59 item analizzati, il valore massimo di quesiti nel corso degli anni oggetto di studio), la linea del P10 sale al 50,00%. Questo incremento dimostra l'efficacia del monitoraggio continuativo nel medio-lungo periodo. Nonostante la severità della check-list sia rimasta elevata, probabilmente gli allevamenti meno virtuosi hanno iniziato ad adeguarsi.

Analizzando i singoli settori produttivi, nel settore del pollame da carne (Figura 3.a) permette di comprendere la natura delle non conformità territoriali.

Negli anni 2017, 2021, 2022, 2023, il sistema ha intercettato problematiche di natura strutturale, più legate probabilmente alla presenza di allevamenti con strutture datate: *presenza di edifici non di pertinenza dell'allevamento, fonti d'acqua vicine all'allevamento e carico di silos non dall'esterno dell'allevamento*.

Negli anni più recenti (2024-2025), desta particolare preoccupazione pratiche gestionali interne scorrette, quali la *fresatura della lettiera in corso di ciclo e la movimentazione routinaria di animali tra capannoni diversi*. Queste evidenze indicano che, gli sforzi futuri dovranno concentrarsi sulla formazione degli operatori e sul rigido rispetto delle procedure di biosicurezza interna durante il ciclo produttivo.

Nel comparto delle ovaiole, una delle principali criticità emerse negli anni 2022-2025 è la *carenza di una ventilazione forzata*. Ciò dimostra la persistenza di quote di allevamenti legati a sistemi di aerazione naturale, epidemiologicamente meno protetti. A questa problematica si sono aggiunti nel periodo più recente (2024-2025) il mancato adeguamento dei *sistemi di abbattimento delle polveri* e la persistente necessità per *gli automezzi del mangime di accedere all'interno del perimetro aziendale per il carico dei silos* (item critico al 50% nel 2025).

L'analisi statistica degli item critici negli allevamenti di svezzamento evidenzia una spiccata vulnerabilità epidemiologica, culminato nel 2025 con il crollo della soglia critica del P10 al 6,67%. Il settore dello svezzamento mostra infatti nel biennio più recente (2024-2025) l'insorgenza di gravissime non conformità prossime allo 0% sugli item relativi alla *presenza di altre specie sensibili (tacchini/selvaggina) e alla reintroduzione di volatili da fiere e mercati*, che espone il comparto a un rischio elevatissimo di introduzione di patogeni.

A queste criticità comportamentali si sommano carenze strutturali e gestionali come per gli altri settori: la mancanza di sistemi di ventilazione esclusivamente forzata e la vicinanza a fonti d'acqua superficiali si confermano come elementi di criticità cronica dal 2021 al 2025. In linea generale per tutto il comparto industriale analizzato, la biosicurezza esterna presenta picchi significativi, arrivando a superare il 45% di item sotto la soglia nel 2021 e abbassandosi nel 2024 e nel 2025. Questo indica che le misure legate ai confini aziendali, alla gestione degli automezzi, alle recinzioni e alle procedure di ingresso (tutto ciò che impedisce ai patogeni di entrare nell'allevamento) rappresentano il punto critico nell'area analizzata in 5 anni su 7; un pattern coerente con quanto osservato a livello europeo, dove la biosicurezza esterna risulta sistematicamente meno performante di quella interna (Van Limbergen et al., 2018).

La biosicurezza esterna rappresenta le misure che impediscono ai patogeni di entrare in azienda, diversamente quella interna impedisce la diffusione del patogeno all'interno dell'allevamento (tra gruppi di animali) (Gelaude et al., 2014).

La costante prevalenza di criticità nella biosicurezza esterna riflette vulnerabilità strutturali di difficile risoluzione e comuni a più settori, quali la vicinanza a fonti d'acqua superficiali, le carenze nei sistemi di ventilazione forzata e le interferenze nei flussi logistici dei mezzi di rifornimento dei mangimi. Questo dato è coerente con quanto documentato in altri contesti europei, dove gli allevamenti con accesso all'aperto o ventilazione naturale mostrano un rischio significativamente maggiore di introduzione di virus influenzali aviari rispetto a quelli con ventilazione forzata, così come la vicinanza a corsi d'acqua superficiali (Bouwstra et al., 2017).

Negli ultimi anni (2024-2025) è la biosicurezza interna a mostrare picchi più alti, a differenza di quella esterna che si abbassa notevolmente.

Quanto sopra riportato trova una duplice spiegazione, sia di natura logistica sia di ordine ispettivo.

Da un lato, le misure esterne sono intrinsecamente legate a vincoli strutturali e ambientali difficilmente modificabili nel breve periodo (quali, ad esempio, l'ubicazione geografica dell'azienda in prossimità di fonti d'acqua superficiali). Al contrario, le procedure interne appaiono teoricamente di più semplice e immediata risoluzione, poiché spesso legate a scelte organizzative o a investimenti minori.

Dall'altro lato, occorre considerare un limite legato all'attività di vigilanza in campo: mentre gli elementi strutturali della biosicurezza esterna sono facilmente standardizzabili e verificabili dal Veterinario Ufficiale durante l'ispezione, le misure gestionali interne (come il reale rispetto dei flussi di personale) sono di complessa e difficile valutazione oggettiva. Esse si basano su comportamenti quotidiani che possono sfuggire alla fotografia istantanea del controllo ufficiale e che quindi richiedono più tempo per essere indagate.

A differenza del settore industriale, il monitoraggio degli allevamenti rurali (familiari) si è basato su un numero costante di 29 item per tutto il periodo 2017-2025. Quindi le oscillazioni del P10 sono interpretabili come reali cambiamenti del livello di biosicurezza sul campo.

L'andamento del P10 riflette chiaramente le tappe gestionali e normative del periodo: il biennio 2021-2022 mostra un netto e progressivo miglioramento delle misure di biosicurezza. Questo trend positivo coincide, così come per il settore industriale, sia con un nuovo avviamento gestionale nel 2021, che ha impresso una maggiore attenzione al comparto, sia con l'introduzione del D.Lgs. n. 134/2022, che ha permesso di mappare e valutare numerose piccole realtà precedentemente escluse dai programmi di sorveglianza.

Nel 2025 si registra un'inversione di tendenza, indice di un calo di attenzione o di una intrinseca difficoltà strutturale nel mantenere gli standard raggiunti. Vigilare sul comparto rurale

resta un pilastro fondamentale per proteggere l'intero settore commerciale e prevenire la diffusione di patologie respiratorie, specialmente nelle aree ad alta densità avicola (*Derksen et al., 2018; Felice et al., 2020*).

È opportuno evidenziare che il Decreto 30 maggio 2023, recante le modalità applicative delle misure di biosicurezza negli allevamenti avicoli, ha introdotto specifici requisiti per gli allevamenti rurali, tra cui l'obbligo di alimentare e abbeverare il pollame al chiuso o sotto adeguate coperture, la protezione di mangimi e lettieri dal contatto con l'avifauna selvatica e la disponibilità di strutture idonee al ricovero degli animali in caso di emergenze epidemiche. Poiché tali requisiti non figurano tra gli item maggiormente non conformi emersi nel presente studio, si può ragionevolmente ritenere che essi siano stati generalmente rispettati dagli allevamenti familiari inclusi nell'indagine.

CONCLUSIONI

Trattandosi di uno studio osservazionale retrospettivo descrittivo, uno dei punti critici è che i dati analizzati derivano da controlli eseguiti da diversi operatori del Servizio Veterinario. Sebbene la pluralità dei rilevatori introduca una possibile variabilità inter-operatore, l'utilizzo di una check-list standardizzata garantisce comunque una sostanziale coerenza e confrontabilità delle osservazioni raccolte.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano un livello di biosicurezza soddisfacente negli allevamenti campione. Le principali non conformità rilevate risultano prevalentemente associate a limiti strutturali storici o a carenze gestionali.

Il presente lavoro evidenzia inoltre il possibile utilizzo dell'analisi del decimo percentile come strumento di supporto alla Sanità Pubblica Veterinaria. Anche in presenza di elevate percentuali assolute di conformità, l'analisi dei percentili consente infatti di identificare gli item relativamente meno performanti e, quindi, le potenziali vulnerabilità del sistema. L'estensione dell'analisi all'intero territorio provinciale potrebbe consentire di focalizzarsi sulle principali criticità attraverso cui agenti patogeni potrebbero introdursi o diffondersi nel comparto avicolo.

Alla luce dei risultati ottenuti, emerge come il miglioramento della biosicurezza futura non dipenderà esclusivamente dall'introduzione di nuove prescrizioni normative, ma soprattutto dalla capacità di adeguare progressivamente le strutture esistenti, rafforzare la formazione degli operatori e mantenere elevato il livello di sorveglianza epidemiologica. In un contesto caratterizzato dalla circolazione dei virus influenzali nell'avifauna selvatica, la biosicurezza deve essere considerata non come un insieme statico di requisiti, ma come un processo dinamico di gestione del rischio, continuamente adattato all'evoluzione dello scenario epidemiologico.

BIBLIOGRAFIA

1. Bouwstra R, Gonzales JL, de Wit S, Stahl J, Fouchier RAM, Elbers ARW. *Risk for Low Pathogenicity Avian Influenza Virus on Poultry Farms, the Netherlands, 2007-2013*. Emerg Infect Dis. 2017 Sep;23(9):1510-1516. doi: 10.3201/eid2309.170276.
2. Decreto Legislativo n° 134 e s.m.i. Disposizioni in materia di sistema di identificazione e registrazione degli operatori, degli stabilimenti e degli animali per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del Regolamento (UDE) 2016/429.
3. Decreto Ministeriale 30 Maggio 2023. Modalità applicative delle misure di biosicurezza negli allevamenti avicoli.
4. Derksen T., R. Lampron, R. Hauck, M. Pitesky, and R. A. 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.

5. Duarte F, Tamminen LM, Kjosevski M, Ciaravino G, Delpont M, Correia-Gomes C, van den Borne BHP, Chantziaras I, Alarcón LV, Svennesen L, Toppari I, Piccirillo A, Gecaj RM, Zbikowski A, Nunes T, Prodanov-Radulović J, De Nardi M, Nedosekov V, Desvars-Larrive A, Allepuz A. *Methods to assess on-farm biosecurity in Europe and beyond*. Prev Vet Med. 2025 Jun;239:106486. doi: 10.1016/j.prevetmed.2025.106486.
6. Felice V, Lupini C, Mescolini G, Silveira F, Guerrini A, Catelli E, Di Francesco A. (2020). *Molecular detection and characterization of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae strains in backyard poultry in Italy*. Poult Sci 99:719–724.
7. Jensen VF, de Knecht LV, Andersen VD, Wingstrand A. *Temporal relationship between decrease in antimicrobial prescription for Danish pigs and the “Yellow Card” legal intervention directed at reduction of antimicrobial use*. Prev Vet Med. 2014 Dec 1;117(3-4):554-64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.08.00
8. Kofler J, Suntinger M, Mayerhofer M, Linke K, Maurer L, Hund A, Fiedler A, Duda J, Egger-Danner C. *Benchmarking Based on Regularly Recorded Claw Health Data of Austrian Dairy Cattle for Implementation in the Cattle Data Network (RDV)*. Animals (Basel). 2022 Mar 22;12(7):808. doi: 10.3390/ani12070808.
9. Poult Sci 2014 Nov;93(11):2740-51. doi: 10.3382/ps.2014-04002. Epub 2014 Sep 5. *Biocheck.UGent: a quantitative tool to measure biosecurity at broiler farms and the relationship with technical performances and antimicrobial use* P Gelaude , M Schlepers , M Verlinden , M Laanen , J Dewulf
DOI: 10.3382/ps.2014-04002.
10. Tilli, G., Laconi, A., Galuppo, F., Mughini-Gras, L., & Piccirillo, A. (2022). Assessing Biosecurity Compliance in Poultry Farms: A Survey in a Densely Populated Poultry Area in North East Italy. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(11), 1409. <https://doi.org/10.3390/ani12111409>.
11. Van Limbergen T, Dewulf J, Klinkenberg M, Ducatelle R, Gelaude P, Méndez J, Heinola K, Pappasolomontos S, Szeleszczuk P, Maes D; PROHEALTH consortium. *Scoring biosecurity in European conventional broiler production*. Poult Sci. 2018 Jan 1;97(1):74-83. doi: 10.3382/ps/pex296.

EVOLUZIONE DI PIATTAFORME IN VITRO PER LO SCREENING DI ANTICOCIDICI NATURALI: APPLICAZIONE ALL'OLIO ESSENZIALE DI TIMO CONTRO EIMERIA TENELLA

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

¹ Vetagro S.p.A., Via Porro 2, 42124 Reggio Emilia (RE), Italia;

² Vetagro Inc., 936 SW 1st Ave, Suite 878 Miami, FL 33130, USA

Summary

This study traces the progressive development of in vitro models used to assess the anti-coccidial activity of thyme essential oil, characterized by the phenolic compounds thymol and carvacrol. Three complementary platforms were employed: (1) a dual-model invasion assay on both MDBK and primary chicken intestinal epithelial cells (cIEC), with cytokine profiling and scanning electron microscopy (2023); (2) a schizogony development assay on MDBK using image analysis and qPCR (2024); and (3) a bioluminescence-based platform employing a transgenic *E. tenella* strain expressing NanoLuciferase (NLuc) (2026). Across all platforms, thyme essential oil consistently demonstrated significant anticoccidial activity, with the technological evolution enabling increasingly precise and biologically relevant quantification.

INTRODUZIONE

La coccidiosi aviaria, causata da *Eimeria* spp., rappresenta una delle principali patologie del pollame a livello mondiale, con costi stimati superiori ai 13 miliardi di dollari annui. La crescente resistenza agli anticoccidici convenzionali e le restrizioni normative sull'uso degli antibiotici hanno stimolato l'interesse verso composti botanici, tra cui l'olio essenziale di timo (TEO), caratterizzato dalla presenza dei fenoli monoterpene timolo e carvacrolo. Parallelamente, la necessità di metodi di screening conformi ai principi delle 3R ha guidato lo sviluppo di modelli in vitro progressivamente più sofisticati. Il presente lavoro sintetizza i risultati ottenuti sull'olio di timo attraverso quattro studi originali e una revisione metodologica condotti tra il 2023 e il 2026, tracciando un excursus evolutivo dei modelli in vitro impiegati.

MATERIALI E METODI

Lo studio ha impiegato tre modelli in vitro per valutare l'attività anticoccidica del TEO (40 ppm) nei confronti di *E. tenella*, lungo il corso del suo ciclo di vita intracellulare. Il trattamento è stato applicato, in tutti gli studi, per tutta la durata dell'esperimento, partendo dall'infestazione.

Studio 1

Nel primo studio [1] le cellule MDBK sono state coltivate in terreno completo e seminate in piastre a 96 well fino a confluenza completa. Le cellule epiteliali intestinali di pollo (cIEC) sono state isolate da embrioni SPF di 19 giorni, digerite enzimaticamente e coltivate su Matrigel con specifici fattori di crescita; dopo 5 giorni hanno raggiunto la confluenza e sono state utilizzate per l'infezione.

Per il saggio di invasione, gli sporozoi di *E. tenella* sono stati purificati e inoculati sulle cellule a una concentrazione di 2×10^4 sporozoi/well. Dopo 24 ore, sono stati raccolti campioni per quantificare gli sporozoi extracellulari e analizzare il DNA/RNA delle cIEC. La qPCR

ha permesso la quantificazione del parassita (gene ITS-1), mentre la RT-PCR ha valutato l'espressione di citochine infiammatorie (IL1 β , IL6, IL8, IL10), normalizzata su geni housekeeping con metodo 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}.

Studio 2

Nel secondo studio [2] è stato utilizzato un ceppo di *E. tenella* transgenico esprime il gene mCitrine, un reporter fluorescente. Cellule MDBK sono state coltivate in piastre a 96 well prima dell'infezione e gli sporozoi di *E. tenella* sono stati aggiunti alle cellule con o senza trattamenti a una concentrazione di 1x10⁵ sporozoi/well. Dopo 4 ore, sono stati rimossi quelli non invasivi e il mezzo di coltura è stato rinnovato. I campioni sono stati raccolti a 24, 48, 72 e 96 hpi post-infezione, inquadrando così la finestra di sviluppo corrispondente alla prima schizogonia. Il DNA è stato estratto e analizzato tramite qPCR per quantificare il parassita, misurando il numero di genomi aploidi tramite il gene 5S rDNA. Altri well sono stati fissati con paraformaldeide e sono stati osservati al microscopio a fluorescenza e analizzati con ImageJ tramite una procedura semi-automatica. Grazie al segnale fluorescente riconducibile in modo specifico al parassita l'analisi ha permesso di identificare numero e dimensioni delle particelle fluorescenti, distinguendo così gli stadi intracellulari. La crescita generale del parassita è stata valutata calcolando l'area media delle particelle per campo.

Studio 3

Nel terzo studio [3], la linea EtNluc è stata ottenuta tramite inserimento del gene della NLuc codificante una nanoluciferasi e selezione di parassiti fluorescenti con FACS sorting. Le cellule MDBK sono state coltivate e infettate con sporozoi a una dose di 2x10⁵ sporozoi/well; la bioluminescenza è stata misurata in relative light units (RLU) come indicatore della presenza e crescita del parassita. L'efficienza di invasione è stata calcolata confrontando i segnali RLU tra campioni trattati e controllo, mentre la replicazione è stata stimata tramite la pendenza della curva di crescita tra 2 e 72 h post-infezione.

RISULTATI

La Tabella 1 riassume i principali risultati ottenuti nella caratterizzazione del TEO come anticcidico. Nello studio 1 [1], il TEO ha ridotto l'infestazione del 37% nelle cellule MDBK e del 29% nelle cIEC a 24 hpi rispetto al controllo infetto. La quantificazione del DNA intracellulare di *E. tenella* in qPCR ha confermato una riduzione significativa del 52% nelle cIEC. L'analisi dell'espressione genica delle citochine ha evidenziato una modulazione della risposta infiammatoria locale, con riduzioni del 21% per IL-6, del 41% per IL-8 e del 47% per IL-10. L'analisi morfologica degli sporozoi al SEM ha mostrato una riduzione significativa dell'area del 20% rispetto al controllo. Nello studio sulla schizogonia [2], l'effetto del TEO è risultato trascurabile a 24 hpi (-4% all'analisi di immagine), per diventare marcato e sostenuto a partire da 48 hpi, con riduzioni dell'area fluorescente media del 64% e del 62% rispettivamente a 48 e 72 hpi. La quantificazione del DNA parassitario in qPCR ha evidenziato un'inibizione dello sviluppo ancora più netta, con riduzioni del 68% a 24 hpi, del 86% a 48 hpi, del 87% a 72 hpi e del 86% a 96 hpi. Nella piattaforma bioluminescente [3], il TEO ha ridotto il segnale NLuc del 84% a 72 hpi, confermando un'inibizione progressiva e sostenuta dello sviluppo intracellulare di *E. tenella*.

Tabella 1. Principali risultati ottenuti nei tre studi sull'effetto anticoccidico di TEO contro *E. tenella*. L'asterisco indica una differenza significativa rispetto al controllo non trattato.

Reference	Modello cellulare	Parassita	Endpoint	Metodica	Dati ottenuti con TEO (vs controllo)
Felici et al 2023 [1]	MDBK e cIEC	<i>E. tenella</i>	24 hpi	Conteggio degli sporozoiti rimasti nel surnatante	↓37% di infestazione in MDBK; * ↓29% di infestazione in cIEC;
	cIEC		24 hpi	Quantificazione del DNA intracellulare di <i>E. tenella</i> in qPCR	↓52 % del DNA di <i>E. tenella</i> *
	cIEC		24 hpi	Analisi di espressione genica citochine (fold of change)	↓21% di espressione di IL6 ↓41% di espressione di IL8* ↓47% di espressione di IL10
	NA		24 hpi	Analisi morfologica degli sporozoiti in SEM (Area μm^2)	↓20% dell'area*
Felici et al 2024 [2]	MDBK	<i>E. tenella</i> con mCitrine	24, 48, 72, 96 hpi	Sviluppo intracellulare con analisi di immagine automatizzata (area media)	↓4% a 24 hpi ↓64% a 48 hpi* ↓62% a 72 hpi* ↓43% a 96 hpi
				Quantificazione del DNA intracellulare di <i>E. tenella</i> in qPCR	↓68% a 24 hpi* ↓86% a 48 hpi* ↓87% a 72 hpi* ↓86% a 96 hpi*
Felici et al 2026 [3]	MDBK	<i>E. tenella</i> con NLuc	2 e 72 hpi	Misurazione della bioluminescenza (RLU)	↓0% dell'infestazione a 2 hpi)* ↓84% dello sviluppo a 72 hpi)*

DISCUSSIONE

I tre studi analizzati rappresentano tappe distinte di un percorso metodologico. Il punto di partenza [1] ha combinato due modelli cellulari di diversa origine, ovvero la linea continua eterologa MDBK, nota in letteratura come il modello di riferimento per gli studi in vitro, e le cIEC, corrispondenti al bersaglio naturale del parassita.

In questo studio, alla conta degli sporozoi nel surnatante è stata affiancata una quantificazione molecolare in qPCR in cellule specie specifiche e una caratterizzazione immunitaria (citochine) e morfologica (SEM) dell'effetto del TEO. Questo approccio multi-endpoint ha rappresentato un salto qualitativo rispetto ai saggi di invasione monoparametrici, introducendo la dimensione della risposta dell'ospite come variabile misurabile. Inoltre, il dato morfologico ha permesso di visualizzare e quantificare l'effetto diretto del TEO sul parassita al suo stadio invasivo, denotando una relazione con la diminuita invasione. Sporozoi più piccoli rispetto al controllo sono meno invasivi, probabilmente a causa di un danno esercitato dal TEO sulla membrana cellulare del parassita.

Il secondo studio [2] ha spostato il focus dalla fase di invasione allo sviluppo intracellulare, estendendo il range temporale fino a 96 hpi e introducendo l'analisi di immagine automatizzata come strumento oggettivo per la quantificazione della schizogonia. La quantificazione del DNA parassitario e l'analisi della fluorescenza media rivela un'inibizione precoce e quasi totale già a 48 hpi. In questo studio l'unione di una metodica molecolare con un'analisi di immagine ha permesso di ottenere un dato il più oggettivo possibile, mediando tra le limitazioni della pluralità di passaggi per la prima e soggettività per la seconda.

Il terzo studio [3] ha rappresentato il salto tecnologico più significativo, introducendo un ceppo transgenico di *E. tenella* esprimente NLuc. Questa piattaforma ha eliminato la necessità di microscopia e qPCR, sostituendole con una misurazione continua, automatizzata e operatore-indipendente della replicazione parassitaria. La riduzione del segnale NLuc del 84% a 72 hpi ottenuta con TEO è in linea con i dati di qPCR precedentemente ottenuti, suggerendo una buona coerenza tra i modelli. Nel complesso, l'evoluzione metodologica descritta contribuisce a rendere lo screening di molecole botaniche più rigoroso e riproducibile, pur nella consapevolezza che i risultati ottenuti in vitro non possono essere direttamente estrapolati all'efficacia in vivo, i quali rimangono necessari per la validazione definitiva dei candidati più promettenti.

CONCLUSIONE

L'insieme dei dati raccolti nei tre studi dimostra che il TEO esercita un'attività anticoccidica significativa e riproducibile nei confronti di *E. tenella*, con effetto prevalente sullo sviluppo intracellulare rispetto alla fase di invasione. L'evoluzione metodologica, dalla conta degli sporozoi alla piattaforma NLuc, ha progressivamente aumentato risoluzione, obiettività e throughput dello screening, validando al contempo i modelli in vitro come strumenti conformi alle 3R per la selezione di molecole botaniche in alternativa agli anticoccidici convenzionali, prima della conferma sperimentale in vivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Felici M, Tugnoli B, Ghiselli F, Baldo D, Ratti C, Piva A and E Grilli. (2023). Investigating the effects of essential oils and pure botanical compounds against *Eimeria tenella* in vitro. *Poultry Science* 102: 102898.
2. Felici M., Tugnoli B., De Hoest-Thompson C., Piva A., Grilli E., Marugan-Hernandez V. (2024). Thyme, oregano, and garlic essential oils and their main active compounds influence *Eimeria tenella* intracellular development. *Animals* 14: 77.
3. Felici M, de Hoest-Thompson C, Tugnoli B, Grilli E and V Marugan-Hernandez. (2026). Bioluminescence-based in vitro assay for rapid and quantitative anticoccidial screening. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 16: 1773469.

TIPIZZAZIONE RAPIDA E ROBUSTA DEL VIRUS DELLA BURSI- TE INFETTIVA (IBDV) MEDIANTE MACHINE LEARNING SENZA ALLINEAMENTO

Franzo G., Cecchinato M., Tucciarone C.M., Poletto F., Andolfatto C., Legnardi M.

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

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is a major cause of immunosuppression in poultry worldwide. Genotypic classification based on sequencing of VP2 and VP1 has improved our understanding of its epidemiology but requires high-quality sequences and phylogenetic analyses. We developed an alignment-free machine-learning approach to rapidly assign IBDV genogroups using commonly sequenced regions of VP2 and VP1. A curated dataset of 5,765 segment A and 1,503 segment B sequences, previously genogrouped by phylogenetic analysis, was encoded as 6-mer frequency profiles and analysed using Random Forest (RF), Artificial Neural Network (ANN) and Support Vector Machine (SVM) classifiers. RF and ANN achieved near-perfect performance and were robust to sequence degradation, tolerating up to 10% ambiguous bases and gaps, whereas SVM performed less well. Classification accuracy decreased markedly outside the validated VP2 and VP1 regions, underscoring the need for standardised PCR targets. The RF model was implemented in a publicly available web-platform enabling rapid genogroup assignment directly from FASTA files, without alignment or phylogenetic inference. This approach provides a fast and reliable alternative to traditional phylogenetic methods for IBDV genotyping, facilitating routine diagnostics and surveillance.

INTRODUZIONE

La bursite infettiva (IBD) rappresenta una malattia immunosoppressiva che causa consistenti perdite economiche nel settore avicolo, poiché aumenta la suscettibilità ad altre infezioni e riduce l'efficacia vaccinale ^{1,2}. L'agente eziologico, il virus della bursite infettiva (IBDV), appartiene alla famiglia *Birnaviridae* e possiede un genoma a doppio filamento di RNA suddiviso in due segmenti: il segmento A, che codifica la proteina capsidica VP2, la proteina VP3 con funzione di scaffolding, la proteasi VP4 e la non strutturale VP5, e il segmento B, che codifica la polimerasi virale VP1 ¹. Soltanto il sierotipo 1 è patogeno per i polli, tuttavia la grande variabilità genetica generata dagli alti tassi di mutazione, ricombinazione e riasortimento ha portato all'emergere di numerosi varianti, tradizionalmente rinominate ceppi classici, *very virulent* e *antigenic variant* ³⁻⁵. Tuttavia, le classificazioni basate sulla patogenicità non riflettono adeguatamente la complessità dell'eterogeneità genetica. I progressi nella disponibilità delle tecniche di sequenziamento hanno consentito lo sviluppo e l'applicazione di efficaci approcci di classificazione basati sul genotipo. I primi tentativi si basavano sulla regione ipervariabile di VP2, a causa del suo ruolo primario nell'antigenicità, nel tropismo cellulare e nella virulenza, portando all'identificazione di sette genotipi (G1-G7) all'interno del sierotipo 1. Successivamente, le crescenti evidenze a supporto della rilevanza di VP1 nella determinazione della patogenicità hanno portato alla sua inclusione negli schemi di classificazione dell'IBDV. Islam et al. hanno proposto un sistema di classificazione basato sulla regione ipervariabile di VP2 e sulla regione B-marker di VP1, che ha portato alla definizione di nove genogruppi VP2 (A1, classico; A2, variante antigenica statunitense; A3, *very virulent*; A4, dIBDV; A5, atipico messicano; A6, atipico italiano; A7, australiano precoce;

A8, variante australiana; e A0, sierotipo 2) e cinque genogruppi VP1 (B1, *classical-like*; B2, *very virulent-like*; B3, *early australian-like*; B4, polacco e tanzaniano; e B5, nigeriano), le cui combinazioni definiscono il genotipo ⁶. Più recentemente, è stato identificato un ulteriore genogruppo VP2 (A9, portoghese) ⁷. All'interno dei genogruppi, in alcuni casi sono stati mantenuti dei sottocladi; in particolare, A1a e A1b identificano rispettivamente i ceppi classici virulenti e quelli attenuati ⁶. Parallelamente, Wang et al. ^{5,8} hanno proposto una classificazione basata su criteri analoghi, definendo lo stesso numero di genogruppi VP2 (A1-A8, AII) e VP1 (B1-B4, BII). Sebbene i due sistemi siano in larga misura sovrapponibili, sono presenti alcune discrepanze in entrambi i segmenti: A1a e A1b vengono considerati due genogruppi distinti (A1 e A8); i due genogruppi australiani di VP2 vengono raggruppati in un unico gruppo A7; il genogruppo nigeriano B5 non viene considerato, mentre i ceppi appartenenti al sierotipo 2 vengono collocati in un genogruppo dedicato (BII). Inoltre, il genogruppo A2 viene ulteriormente suddiviso in quattro lineaggi, consentendo di distinguere tra le varianti antigeniche statunitensi (A2a-A2c) e le nuove varianti antigeniche emergenti (A2d) ⁵. Sebbene la progressiva standardizzazione di questa nomenclatura abbia favorito la comprensione dell'epidemiologia globale, la loro applicazione nelle routine diagnostiche è limitata dalla necessità di sequenze di alta qualità, dataset di riferimento curati e analisi filogenetiche dispendiose in termini di tempo ed esperienza. Pertanto, vi è la necessità di metodi rapidi e affidabili che richiedano competenze e risorse minime.

MATERIALI E METODI

Dataset

Le sequenze di riferimento fornite da Islam et al. ⁶ e Wang et al. ⁸ per i segmenti A e B sono state scaricate e annotate con il corrispondente genogruppo secondo la classificazione proposta da Islam et al. (2021), con la sola aggiunta della suddivisione dei ceppi A2 in varianti antigeniche statunitensi (*US variant*) e nuove varianti antigeniche (*novel variant*), corrispondenti rispettivamente ai lineaggi A2a-c e A2d secondo Wang et al. (2021). Le sequenze sono state allineate con MAFFT ⁹ e tagliate per includere la regione ipervariabile di VP2 (nucleotidi 785–1150) e la regione B-marker di VP1 (nucleotidi 328–834). Ulteriori sequenze VP2 e VP1 disponibili in GenBank sono state scaricate, allineate e sottoposte a trimming; quelle incomplete o di bassa qualità sono state scartate. L'assegnazione ai genogruppi è stata verificata mediante analisi filogenetica a massima verosimiglianza con IQ-TREE, utilizzando 10000 repliche bootstrap ¹⁰. Il dataset finale comprendeva 5765 sequenze del segmento A (genogruppi A0–A9) e 1503 sequenze del segmento B (genogruppi B1–B5).

Modelli di machine learning

Generazione dei dataset di training e test

Per la validazione dei metodi di machine learning (ML), sono stati preparati dataset indipendenti di training e test sia per il segmento A sia per il segmento B, utilizzando il medesimo approccio metodologico. I file FASTA precedentemente generati sono stati importati in R. Poiché l'approccio predittivo adottato era indipendente dall'allineamento (*alignment-free*), eventuali gap (“-”) presenti nelle sequenze sono stati rimossi. Il genotipo assegnato a ciascuna sequenza è stato identificato sulla base dell'annotazione riportata nell'etichetta della sequenza. Tutte le sequenze sono state codificate come profili di frequenza di 6-mer (ossia 4.096 variabili) utilizzando. L'80% del dataset risultante è stato selezionato come dataset di training mediante una suddivisione casuale stratificata in base alla frequenza dei genotipi. Il restante 20% è stato mantenuto come dataset di test indipendente e non è stato incluso nelle analisi successive.

Per ridurre la complessità del dataset di training, sono stati applicati diversi passaggi di

pre-processing, comprendenti centratura e standardizzazione delle variabili, rimozione delle caratteristiche con varianza prossima allo zero e analisi delle componenti principali (PCA). In base a tale procedura, sono state mantenute rispettivamente 118 e 96 componenti principali per i dataset basati su VP2 e VP1, spiegando il 95% della varianza totale. Per gestire lo sbilanciamento tra classi (ossia tra genogruppi), è stata applicata la tecnica Synthetic Minority Over-sampling Technique (SMOTE), al fine di generare campioni sintetici per i genogruppi meno rappresentati.

Addestramento dei modelli di machine learning

Sono stati valutati tre differenti algoritmi di machine learning: Random Forest (RF; pacchetto randomForest), Support Vector Machine con kernel radiale (SVM; pacchetto kernlab) e rete neurale artificiale (ANN; pacchetto nnet). Gli iperparametri responsabili del compromesso bias-varianza, finalizzato a massimizzare le prestazioni predittive limitando al contempo il rischio di sovra-adattamento al dataset di training, sono stati ottimizzati definendo una griglia di possibili combinazioni di parametri e valutandole iterativamente mediante una procedura di cross-validazione a 10 fold ripetuta 10 volte. Il modello caratterizzato dalla maggiore accuratezza è stato selezionato come classificatore finale. Oltre all'accuratezza, sono stati calcolati anche sensibilità (Se), specificità (Sp), coefficiente kappa di Cohen (κ) e area sotto la curva ROC (AUC). Le prestazioni predittive stimate mediante la procedura di cross-validazione ripetuta sono state confrontate tra i diversi modelli. Le differenze di performance sono state valutate mediante test t a coppie con correzione di Bonferroni. Le prestazioni dei modelli validati sono state successivamente valutate utilizzando il dataset di test indipendente. Le performance sono state quantificate mediante accuratezza, sensibilità, specificità, κ e AUC, mentre confusion matrix sono state calcolate e visualizzate per descrivere in maggiore dettaglio i pattern e le eventuali problematiche classificative dei modelli.

Valutazione della robustezza del modello

La robustezza dei modelli validati rispetto alla riduzione della qualità delle sequenze è stata valutata introducendo degradazioni casuali sull'intero dataset. Per ciascuna sequenza, la degradazione è stata simulata introducendo livelli controllati di due differenti tipologie di errore casuale: inserimento di caratteri gap ("–") e sostituzione di nucleotidi con basi ambigue ("N"). La proporzione di gap e ambiguità variava tra 0 e 10%, e sono state valutate molteplici combinazioni delle due tipologie di errore. Per ogni combinazione sono state generate 10 repliche indipendenti per sequenza, al fine di tenere conto della variabilità stocastica. Le sequenze degradate sono state quindi sottoposte agli stessi passaggi di pre-processing descritti in precedenza e successivamente classificate mediante i modelli sviluppati. Le prestazioni sono state valutate calcolando accuratezza, sensibilità, specificità, κ e AUC attraverso il confronto con il genotipo assegnato mediante analisi filogenetica.

Applicabilità dei modelli sviluppati a diverse regioni della VP1 e VP2

Per valutare se regioni alternative degli allineamenti potessero essere utilizzate per l'inferenza dei genogruppi, sono stati considerati gli allineamenti completi dei segmenti A e B senza il trimming preliminare alle regioni di riferimento. Tuttavia, per garantire la coerenza con le analisi precedenti, sono stati mantenuti i genogruppi assegnati sulla base delle analisi filogenetiche dei dataset ridotti secondo quanto proposto da Islam et al. ⁶ e Wang et al. ⁸.

Gli allineamenti completi sono stati analizzati mediante sliding window, utilizzando finestre di 400 nucleotidi con passi di 10 nucleotidi. Per ciascuna finestra, le sequenze contenenti più del 10% di gap sono state escluse, poiché considerate indicative di una copertura assente o incompleta. Le sequenze rimanenti sono state quindi sottoposte al medesimo flusso di pre-pro-

cessing e alla successiva predizione del genogruppo. Per ogni finestra sono stati calcolati e registrati i relativi indicatori di performance.

RISULTATI

Un totale di 5.765 sequenze è stato incluso nel dataset del segmento A, comprendente 15 A0, 463 A1a, 477 A1b, 596 A2d, 791 A2US, 3.131 A3, 166 A4, 34 A5, 11 A6, 43 A7, 15 A8 e 23 A9. Per il segmento B, sono state incluse complessivamente 1.503 sequenze, appartenenti ai genogruppi B1 (843 sequenze), B2 (414), B3 (121), B4 (53) e B5 (72).

Per il segmento A, i modelli RF e ANN hanno entrambi raggiunto accuratèzze medie di cross-validazione di 0.999, con valori di sensibilità macro e specificità macro ≥ 0.999 e AUC perfettamente pari a 1. Il coefficiente κ di Cohen era praticamente uguale a 1 per entrambi. Al contrario, il modello SVM ha mostrato prestazioni nettamente inferiori (accuratèzza 0.4747, κ 0.380, sensibilità 0.41, AUC 0.89) pur mantenendo una buona specificità (0.946). Le analisi di confronto tra modelli hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra RF/ANN e SVM per tutti gli indici, mentre non sono emerse differenze significative tra RF e ANN. Per il segmento B, sia RF che ANN hanno presentato prestazioni quasi perfette (accuratèzza ≥ 0.999 , AUC = 1, $\kappa \geq 0.999$), mentre l'SVM ha ottenuto un'accuratèzza media di 0.851, sensibilità di 0.812 e κ di 0.794.

Considerando il dataset di test, l'RF e l'ANN hanno mantenuto una precisione elevatissima: per il segmento A l'accuratèzza è stata 0.998 per RF e 0.997 per ANN, con κ di 0.997 e 0.996 e sensibilità macro di 0.998 e 0.999; per il segmento B entrambi i modelli hanno fornito predizioni esatte al 100 %. L'SVM ha classificato non correttamente numerosi isolati: nel segmento A l'accuratèzza è scesa a 0.773 con sensibilità 0.357, mentre nel segmento B era 0.876, con sensibilità 0.768. Le matrici di confusione hanno mostrato solo due errori per RF nel segmento A (un isolato A1b classificato come A2US e uno A2d come A2US) e tre per l'ANN (A2d classificato come A2US, A2US come A4 e A3 come A1a); l'SVM ha evidenziato una tendenza a confondere i genogruppi A1, A2 e A3. Per il segmento B, RF e ANN non hanno commesso errori, mentre l'SVM tendeva a classificare non correttamente B1 e B2 con B3.

L'analisi di robustezza ha mostrato che RF e ANN sono in grado di tollerare fino al 10 % di basi ambigue ("N") o gap senza perdere significativamente in accuratèzza: con una degradazione del 10% di entrambi gli errori, per il segmento A l'accuratèzza dell'RF risultava 0.897 e quella dell'ANN 0.806, mentre per il segmento B risultava 0.915 e 0.869. La SVM al contrario perdeva gran parte della capacità predittiva (accuratèzza 0.543 per il segmento A e 0.558 per il segmento B). I valori di κ , sensibilità e AUC rispecchiavano questa tendenza, confermando la superiorità del RF nel contesto di sequenze di qualità subottimale. Infine, l'approccio a sliding window lungo l'intero allineamento ha evidenziato che le prestazioni dei modelli diminuiscono bruscamente al di fuori delle regioni validate di VP2 e VP1.

DISCUSSIONE

La standardizzazione della classificazione dei ceppi di IBDV basata su criteri genetici ha migliorato significativamente la comprensione dell'epidemiologia del virus, fornendo una nomenclatura condivisa e una capacità discriminativa molto superiore rispetto ai soli approcci fenotipici. Tuttavia, permangono diverse criticità pratiche. La qualità delle sequenze, la presenza di allineamenti incompleti o errati e la scelta di modelli evolutivi inappropriati possono influenzare l'affidabilità dell'inferenza filogenetica e, di conseguenza, l'assegnazione del genotipo. Inoltre, il tempo e le competenze necessarie per curare dataset di riferimento ed eseguire analisi filogenetiche possono limitarne l'applicazione nei laboratori diagnostici privi di supporto bioinformatico dedicato. Una valida alternativa utilizzata nella diagnostica

di routine è il confronto delle sequenze mediante BLAST. Tuttavia, questo strumento non è stato sviluppato per la genotipizzazione e si basa su annotazioni spesso non standardizzate, talvolta errate e raramente accompagnate da informazioni sui criteri di classificazione utilizzati. Poiché il database nucleotidico di NCBI non è sottoposto a una revisione specialistica continua, errori di classificazione possono essere presenti e perpetuarsi nel tempo.

I modelli sviluppati nel presente studio sono stati invece addestrati e validati utilizzando un dataset altamente curato, costituito da sequenze precedentemente classificate mediante confronto con ceppi di riferimento e secondo schemi tassonomici ampiamente accettati. Nonostante ciò, l'aumento costante del numero di sequenze disponibili continua a rappresentare una sfida, poiché molti cluster storici sono stati definiti sulla base di un numero limitato di sequenze rappresentative. In questo studio si è scelto di mantenere la coerenza con gli schemi di classificazione attualmente riconosciuti, pur riconoscendo che alcune ambiguità rimangono, in particolare per i sottogruppi all'interno dei genogruppi A1 e A2.

La codifica delle sequenze come profili di frequenza di 6-mer ha eliminato la necessità di effettuare allineamenti preliminari, evitando potenziali errori dovuti a misallineamenti, differenze di lunghezza, mutazioni frameshift o qualità subottimale delle sequenze, oltre a ridurre considerevolmente i tempi di analisi. Sia l'approccio Random Forest (RF) sia quello basato su reti neurali artificiali (ANN) hanno mostrato prestazioni praticamente perfette sia durante la validazione sia sul dataset di test indipendente. Le elevate performance osservate, confermate anche nelle analisi di robustezza, indicano l'assenza di fenomeni rilevanti di overfitting e supportano l'applicabilità dei modelli in contesti diagnostici reali. Prestazioni analogamente elevate sono state ottenute anche nella classificazione a livello di sotto-genogruppo. In particolare, la distinzione tra A1a e A1b, introdotta da Islam et al. e oggi ampiamente adottata, appare discutibile da un punto di vista strettamente filogenetico, poiché il genogruppo A1 non forma un clade monofiletico nelle filogenesi basate sulla regione ipervariabile di VP2. Tale suddivisione sembra quindi giustificata principalmente da motivazioni storiche e pratiche, mentre la classificazione proposta da Wang et al., che distingue i genogruppi A1 e A8, risulta più coerente con la struttura filogenetica osservata. Ciononostante, i modelli sviluppati sono stati in grado di discriminare in maniera affidabile questi gruppi.

Considerazioni parzialmente analoghe riguardano il genogruppo A2. Sebbene la distinzione tra i sottogruppi A2A-C appaia in parte arbitraria, le evidenze filogenetiche ed epidemiologiche supportano chiaramente la separazione tra le varianti antigeniche statunitensi e le cosiddette *novel variant* (A2d). Per questo motivo, nel presente studio sono state mantenute esclusivamente queste due categorie, entrambe correttamente identificate dai modelli RF e ANN. Anche il genogruppo B1 ha fornito spunti interessanti. Sebbene Wang et al. abbiano proposto la distinzione tra B1a e B1b, le nostre analisi hanno evidenziato un clade ben definito comprendente ceppi con caratteristiche VP2 tipiche dei ceppi *very virulent* (A3B1), corrispondente al cosiddetto clade italiano/russo/mediorientale. Studi precedenti avevano già evidenziato la peculiarità evolutiva di questi virus a livello del segmento B, suggerendo che essi possano rappresentare almeno un lineaggio distinto all'interno del genogruppo B1. Al contrario, i ceppi appartenenti al sierotipo 2 non formano un gruppo monofiletico, fornendo uno scarso supporto al genogruppo BII proposto da Wang et al.⁸.

La qualità non ottimale delle sequenze rappresenta una problematica frequente nei laboratori diagnostici, particolarmente in ambito veterinario, dove la qualità iniziale dei campioni, il pooling e i vincoli economici possono influenzare negativamente il risultato finale. Gap e basi ambigue costituiscono gli errori più comuni nelle sequenze ottenute mediante metodo Sanger. I modelli RF e ANN hanno dimostrato un'elevata robustezza a tali problematiche, mantenendo prestazioni elevate anche in presenza del 10% di basi ambigue e gap. Tuttavia, ciò non deve essere interpretato come una giustificazione all'utilizzo di sequenze di scarsa

qualità, poiché l'accuratezza tende progressivamente a diminuire con l'aumentare della degradazione. Inoltre, la presenza di numerose basi ambigue può riflettere coinfezioni da ceppi differenti, rendendo biologicamente inappropriata qualsiasi classificazione.

Un ulteriore problema riguarda l'eterogeneità dei protocolli diagnostici, che spesso porta al sequenziamento di regioni di VP1 o VP2 differenti da quelle comunemente utilizzate per la genotipizzazione. L'analisi mediante sliding window sull'intero allineamento ha mostrato un netto peggioramento delle prestazioni al di fuori delle regioni validate, evidenziando l'importanza di utilizzare protocolli standardizzati per la generazione degli ampliconi destinati al sequenziamento.

Per favorire l'applicazione pratica dei modelli sviluppati è stata realizzata una piattaforma web (GumboType), che consente la predizione automatica dei genogruppi e delle relative probabilità di classificazione a partire da file FASTA contenenti sequenze dei segmenti A e/o B. Quando le sequenze dei due segmenti condividono lo stesso identificativo, il sistema restituisce automaticamente il genotipo completo derivante dalla combinazione dei genogruppi dei segmenti A e B.

Sebbene RF e ANN abbiano mostrato prestazioni sostanzialmente equivalenti, le analisi di robustezza hanno evidenziato una lieve superiorità del modello RF, che è stato quindi scelto per l'implementazione pubblica dello strumento. I dataset di riferimento e i modelli saranno aggiornati periodicamente per riflettere i futuri sviluppi della classificazione dell'IBDV.

Nel complesso, questo studio dimostra come approcci di machine learning applicati a dataset accuratamente curati possano consentire una classificazione rapida, robusta e affidabile dei ceppi di IBDV, rendendo disponibile alla comunità scientifica uno strumento facilmente utilizzabile anche in assenza di competenze bioinformatiche specialistiche.

CONCLUSIONI

Nel complesso, questo studio dimostra come l'impiego di metodi di machine learning su dataset accuratamente curati consenta una genotipizzazione rapida e affidabile dei ceppi di IBDV in accordo con gli schemi di classificazione attualmente riconosciuti. Per facilitarne l'applicazione nella diagnostica di routine, il modello risultato più robusto (Random Forest) è stato implementato in una piattaforma web gratuita e periodicamente aggiornata, utilizzabile anche da operatori privi di specifiche competenze bioinformatiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Etteradossi N and YM Saif. (2019). Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (Eds.), *Diseases of Poultry*, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, pp. 257–283.
2. Rautenschlein S and TN Alkie. (2016). Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 7: 9.
3. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Archives of Virology*, 162: 3661–70.
4. de Fraga AP, Gräf T, Coltro VP, Ikuta N, Fonseca ASK, Majó N and VR Lunge. (2019). Phylodynamic analyses of Brazilian antigenic variants of infectious bursal disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 73: 159–66.
5. Wang W, He X, Zhang Y, Qiao Y, Shi J, Chen R, Chen J, Xiang Y, Wang Z, Chen G, Huang J, Huang T, Wei T, Mo M, and P Wei. (2022). Analysis of the global origin, evolution and transmission dynamics of the emerging novel variant IBDV (A2dB1b): The accumulation of critical aa-residue mutations and commercial trade contributes to the emergence and transmission of novel variants. *Transboundary and Emerging Diseases* 69: e2832–e2851.

6. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Etteradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathology*, 50(2): 190-206.
7. 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.
8. Wang Y, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X and X Qi. (2021). An improved scheme for infectious bursal disease virus genotype classification based on both genome-segments A and B. *J. Integr. Agric.* 20: 1372-1381.
9. Kazutaka K and D Standley. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772–80.
10. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A and BQ Minh. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 268–74.

MONITORAGGIO DELLA DIFFUSIONE E DELL'IMPATTO DEGLI AGENTI IMMUNODEPRESSIVI VIRALI NEL POLLO DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI DI UNO STUDIO LONGITUDINALE

Giacomelli M.¹, Zambon I.², Soncin M.², Dall'Angelo A.³, Broggi M.⁴, Galbusera F.⁵, Pirotta M.⁶, Barbuto B.², Domizio A.², Bottinelli M.¹, Di Schiavi M.T.¹, Marcolin S.¹, Bertazzo V.², Fusaro A.², Zanardello C.², Bortolami A.²

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

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Sede centrale - Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)*

³*Cooperativa Agricola San Martino, via Sommacampagna 63/H, 37135 Verona*

⁴*Veterinario avicolo, 40128 Bologna*

⁵*Tecnico di allevamento avicolo, 23900 Lecco*

⁶*Veterinario avicolo, 22100 Como*

Summary

Immunosuppression is a major challenge in modern poultry production because it affects flock health and productivity. Among the infectious causes of immunosuppression, viral infections caused by Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), Marek Disease Virus (MDV) and Avian Reovirus (ARV) are the most important. A longitudinal field study was conducted to investigate the occurrence and impact of these immunosuppressive viruses in commercial broiler flocks within the densely populated poultry area of northern Italy. Two broiler farms located in Verona province were monitored over consecutive production cycles between August 2025 and May 2026. During each cycle, five birds were sampled at 14, 21, 28, 35 and 42 days of age. Necropsy, bacteriological, parasitological, virological, and serological investigations were performed. Preliminary results showed widespread circulation of ARV and IBDV, whereas CIAV was detected only sporadically. No field strains of MDV were identified. ARV was detected predominantly during the first weeks of the production cycles and was frequently detected in birds with enteritis and arthritis/tenosynovitis, supporting its potential role in the pathogenesis of these conditions. IBDV was detected mainly during the mid-late stages of the cycle and was more frequently identified in one of the two monitored farms.

These preliminary findings suggest that ARV and IBDV circulate widely in commercial broiler farms and may contribute to subclinical immunosuppression, thereby favouring secondary bacterial infections and potentially impairing vaccine-induced immunity. Further integration of histopathological and immunological data will help clarify the functional impact of these viral infections on broiler health and productivity.

INTRODUZIONE

L'immunodepressione rappresenta un problema rilevante nell'avicoltura moderna, in quanto, sebbene nella maggior parte dei casi decorra in maniera apparentemente silente, determina una compromissione della risposta immunitaria in grado di aumentare la suscettibilità alle infezioni secondarie e compromettere i parametri produttivi (Gimeno & Schat, 2018). Nel pollo da carne le infezioni virali, in particolare quelle sostenute da Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), Marek Disease Virus (MDV) e Avian Reovirus (ARV), rappresentano le principali cause infettive di immunodepressione. Tali virus infatti, seppur agendo con meccanismi patogenetici diversi, inducono un'alterazione della funzionalità

del sistema immunitario. Anche in assenza di manifestazioni cliniche evidenti e nonostante l'implementazione di misure di biosicurezza e profilassi vaccinali, tali infezioni possono determinare forme subcliniche in grado di ridurre l'efficacia vaccinale, aumentare mortalità e disomogeneità dei gruppi, peggiorare le performance zootecniche e favorire l'insorgenza di patologie secondarie, con importanti ricadute economiche e sanitarie, incluso un maggiore ricorso ai trattamenti antimicrobici (Gimeno & Schat, 2018; Schat & Skinner, 2022).

Sulla base di queste considerazioni è stato sviluppato un progetto di ricerca finalizzato a valutare la diffusione dei principali virus immunosoppressivi nell'allevamento industriale del pollo da carne e a definire il loro impatto sulle condizioni sanitarie e produttive. A tale scopo è stato adottato un approccio sistematico e integrato che associa indagini anatomopatologiche, virologiche, sierologiche, istopatologiche, immunologiche e genetiche con dati clinico-produttivi, con il fine ultimo di identificare strategie gestionali e vaccinali migliorative. La ricerca è stata condotta nell'area ad alta densità avicola (DPPA) del Veneto, in quanto caratterizzata da un'elevata pressione infettiva e, di conseguenza, da un maggiore rischio di diffusione degli agenti patogeni tra siti produttivi e cicli successivi. Nell'ambito di questo progetto multidisciplinare, il presente contributo riporta i risultati preliminari relativi alla diffusione dei virus, ai riscontri sierologici e ai principali quadri anatomopatologici osservati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Tra agosto 2025 e maggio 2026 sono stati monitorati 2 allevamenti di polli da carne (denominati "allevamento 1" e "allevamento 2") siti in provincia di Verona, seguendo gli animali di cicli produttivi successivi. In ciascun ciclo è stato eseguito il campionamento di 5 carcasse a 14, 21, 28, 35 e 42 gg di età, in modo tale da coprire in modo standardizzato le principali fasi del ciclo del broiler (prima fase post-accasamento, fase intermedia e fine ciclo). Immediatamente prima del carico (45-50 gg) sono stati eseguiti prelievi di sangue da un minimo di 5 soggetti, per valutare lo stato immunitario a fine ciclo. Per ciascun gruppo monitorato sono inoltre stati registrati i dati relativi alla mortalità, al peso alla macellazione e trattamenti terapeutici eventualmente eseguiti.

Esame necroscopico e approfondimenti batteriologici e parassitologici

Le carcasse sono state sottoposte ad esame necroscopico allo scopo di valutare lo stato sanitario del gruppo. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame parassitologico a fresco da due tratti intestinali. Il soggetto con quadro anatomopatologico più grave è stato selezionato per approfondimenti batteriologici, effettuati mediante semina su MacConkey agar, Bile Esculin Azide agar e agar sangue, incubati a 37° C in aerobiosi, nonché su agar sangue incubato a 37 °C in atmosfera arricchita al 5% di CO₂. Per la ricerca di *Clostridium* spp. la semina è stata eseguita su agar sangue e Perfringens Agar Base incubati in anaerobiosi. Le piastre sono state esaminate dopo 24 e 48 ore di incubazione.

Per eseguire uno screening dello stato immunitario sono inoltre stati prelevati sistematicamente campioni di milza, timo, borsa di Fabrizio, intestino (due tratti: ansa duodenale e un tratto a monte del diverticolo di Meckel), poi sottoposti ad analisi virologiche in singolo per ciascun soggetto. Un'aliquota di milza, timo, borsa di Fabrizio e midollo osseo è stata fissata in formalina tamponata al 10% per essere sottoposta ad esame istologico. In presenza di lesioni tendinee e/o articolari sono stati inoltre prelevati il tendine del gastrocnemio, destinato alla ricerca molecolare di ARV e all'esame istologico, e l'articolazione tibiotarsometatarsica, destinata all'esame istologico. I risultati dell'approfondimento istologico saranno presentati in un altro contributo scientifico nell'ambito presente Simposio.

Analisi virologiche

a) Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)

La ricerca di IBDV è eseguita da borsa di Fabrizio e milza mediante one-step real-time RT-PCR (rRT-PCR) su RNA, con target in regione del gene VP4, adottando un formato multiplex con doppia sonda per identificare virus “classical” e “very virulent”.

b) Chicken infectious anemia virus (CIAV)

La ricerca di CIAV è stata condotta mediante PCR convenzionale su DNA estratto da timo, borsa di Fabrizio e milza utilizzando una metodica di origine interna. I campioni risultati positivi sono stati confermati mediante sequenziamento Sanger.

c) Avian reovirus (ARV)

Per la ricerca di ARV, eseguita su tutti i campioni di intestino ed eventualmente da tendini con lesioni, è stato eseguito uno screening mediante one-step real-time RT-PCR basato su metodica Tang *et al.* (2016) modificata.

d) Malattia di Marek (MDV)

La ricerca di MDV è stata eseguita mediante real-time PCR (rPCR) su DNA estratto da milza. I campioni positivi sono stati sottoposti a discriminazione ceppo vaccinale vs patogeno tramite rPCR SYBR Green con analisi basata su temperatura di melting (T_m).

Analisi sierologiche

a) Infectious Bursal Disease Virus (IBDV)

La ricerca di anticorpi verso IBDV è stata condotta mediante ELISA su siero utilizzando sia kit commerciali per la ricerca di anticorpi verso l'antigene intero, sia kit validati in grado di rilevare gli anticorpi rivolti verso la proteina VP2 del virus.

b) Chicken infectious anemia virus (CIAV)

La ricerca di anticorpi verso CIAV è stata condotta mediante ELISA su siero utilizzando kit commerciale. In assenza di indicazioni specifiche sullo status vaccinale, è applicato il protocollo di diluizione previsto dal kit per la rilevazione di un'esposizione a virus di campo.

c) Avian reovirus (ARV)

La presenza di anticorpi verso ARV è stata valutata mediante ELISA su siero, utilizzando un kit commerciale secondo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati analizzati alla diluizione prevista dal protocollo del kit e i risultati sono stati interpretati sulla base dei relativi valori soglia.

d) Newcastle disease virus (NDV)

La presenza di anticorpi verso NDV è stata valutata mediante prova di inibizione dell'emoagglutinazione (HI), utilizzando globuli rossi di pollo secondo procedura WOA (WOAH Terrestrial Manual, Chapter 3.3.10, Newcastle disease). I titoli sono stati espressi come reciproco della massima diluizione sierica in grado di inibire completamente l'emoagglutinazione.

RISULTATI

Al momento della stesura del presente contributo scientifico è stato completato il monitoraggio dell'allevamento 2 (4 cicli produttivi), mentre per l'allevamento 1 è stato concluso il mo-

nitoraggio di 3 dei 4 cicli previsti, per un totale di 34 sessioni necroscopiche eseguite. Nel 3° ciclo dell'allevamento 2 l'ultimo campionamento è stato eseguito a 35 anziché 42 gg poiché il gruppo è stato macellato anticipatamente. Nel complesso, le performance produttive sono risultate compatibili con un quadro non caratterizzato da eventi acuti di elevata gravità, pur con differenze apprezzabili tra allevamenti, cicli e sesso degli animali. La mortalità complessiva ha mostrato fluttuazioni tra i cicli, comprese tra circa 2,5% e 7,66%. Nell'allevamento 1, il ciclo 1 ha presentato il profilo più favorevole, con mortalità complessiva pari a 3,7% e mortalità finale nei maschi pari a 3,6%, mentre nei cicli 2 e 3 è stato osservato un aumento della mortalità maschile fino al 6,1%. Tale differenza è risultata particolarmente evidente nella fase finale del ciclo di allevamento, con un incremento più marcato della mortalità maschile dopo la quarta settimana. Le femmine dell'allevamento 1 hanno invece mostrato valori di mortalità più contenuti nei cicli con dato disponibile, pari a 1,4% nel ciclo 1 e 1,9% nel ciclo 2. Nell'allevamento 2, le differenze tra cicli sono risultate ancora più evidenti. Il ciclo 1 ha presentato la mortalità complessiva più elevata, pari a 7,66%, con valori finali del 6,46% nelle femmine e dell'8,38% nei maschi. Nel ciclo 2 la mortalità complessiva si è ridotta al 5,32%, pur permanendo un'elevata mortalità nei maschi, pari a 7,53%, a fronte di un valore più contenuto nelle femmine, pari a 3,62%. Il ciclo 3 ha mostrato invece un andamento più favorevole in termini di mortalità, con valori finali pari a 2,09% nelle femmine e 2,82% nei maschi, sebbene il confronto con gli altri cicli debba tenere conto della macellazione anticipata. Nel complesso, le differenze produttive osservate non sembrano quindi riconducibili a un unico indicatore, ma riflettono una combinazione di fattori gestionali e problematiche clinico-sanitarie concomitanti.

Esami necroscopici e approfondimenti batteriologici e parassitologici

In entrambi gli allevamenti, pur con una certa variabilità tra i gruppi monitorati, è stato rilevato un andamento delle lesioni anatomopatologiche piuttosto costante, con la prevalenza di forme enteriche nelle prime fasi (14 e 21 gg), rappresentate prevalentemente da enterite catarrale e talvolta da enterite necrotica. Occasionalmente, in un numero limitato di soggetti e solo in 2 cicli dell'allevamento 2 (cicli 2 e 3) e nel ciclo 2 dell'allevamento 1, in queste fasi sono state rilevate anche polisiepositi (che si riscontrano sporadicamente (in 1-2 soggetti e non in tutti i cicli) anche nei due *time point* successivi. Con il progredire del ciclo, a 28 e 35 gg, si riduce la frequenza delle forme enteriche, mentre compaiono o aumenta la frequenza di lesioni a carico dell'apparato locomotore, le quali si riscontrano in tutti i gruppi monitorati e tendono ad aumentare con il progredire dell'età. A partire da 28 gg si osserva la comparsa di artrosinoviti, soprattutto a carico dell'articolazione tibiotarsometatarsica, in 1-2 soggetti di 3 cicli dell'allevamento 2, che a 35 gg aumentano in frequenza e si rilevano in tutti i gruppi monitorati. Nell'allevamento 1 questa lesione è stata osservata in 2 cicli a 35 giorni di età in 1-3 soggetti. In queste stesse fasi (28-35 gg) si nota anche un aumento nella frequenza di lesioni ossee a carico dell'epifisi prossimale del femore, riconducibili a osteonecrosi, e la comparsa di spondilite a carico della vertebra toracica libera, riscontrata in ben 2 cicli su 3 dell'allevamento 1 e in 3 su 4 nell'allevamento 2, con in entrambi i casi un picco della frequenza di riscontro di questa lesione a 42 gg. In questa ultima fase del ciclo produttivo le lesioni osteo-articolari e vertebrali rappresentano spesso il reperto predominante. Le alterazioni rilevate a carico degli organi linfatici riguardano soprattutto la milza, spesso megalica nei soggetti patologici. Sporadicamente, in pochi soggetti e in cicli e a età variabili, sono state rilevate alterazioni a carico della borsa di Fabrizio, rappresentate soprattutto da congestione e raramente da lieve edema. Talvolta sono state rilevate differenze nelle dimensioni di timo e borsa di Fabrizio tra animali della stessa età e dello stesso ciclo.

Escherichia coli è il batterio di più frequente riscontro, isolato in tutti i cicli produttivi di

entrambi gli allevamenti in concomitanza sia di forme respiratorie, sia di forme enteriche. In quest'ultimo caso talvolta è stato isolato anche *Clostridium perfringens*. Nell'ambito dei quadri di zoppia, il principale agente eziologico è rappresentato da *E. coli* nel caso di artrosinoviti e necrosi della testa del femore, mentre nella pressoché totalità dei casi di spondilite è stato isolato *Enterococcus cecorum*.

Le parassitosi sono risultate limitate alla presenza di coccidi, rilevati con frequenza e in tempi variabili, a seconda del gruppo di animali e dell'allevamento, ma quasi sempre in bassa carica. Nell'allevamento 1 sono stati riscontrati più frequentemente, soprattutto a partire dai 28 gg, per poi protrarsi fino a fine ciclo, con un maggior numero di animali colpiti e una carica maggiore nel ciclo 2. Nell'allevamento 2, ciclo 4, gli esami parassitologici sono risultati costantemente negativi, mentre nel ciclo 3 coccidi sono stati rilevati solo in un soggetto a 21 gg.

Analisi virologiche

I risultati delle indagini virologiche sono riassunti in Fig. 1 e 2.

Figura 1. Allevamento 1: rappresentazione grafica della rilevazione molecolare di Avian Reovirus (ARV), Chicken Anemia Virus (CAV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) e Marek's disease virus (MDV) in diversi tessuti e fasi di allevamento.

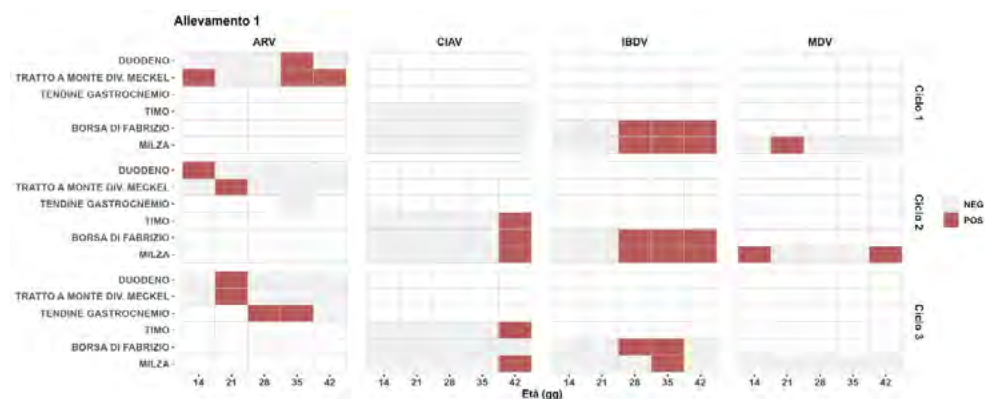
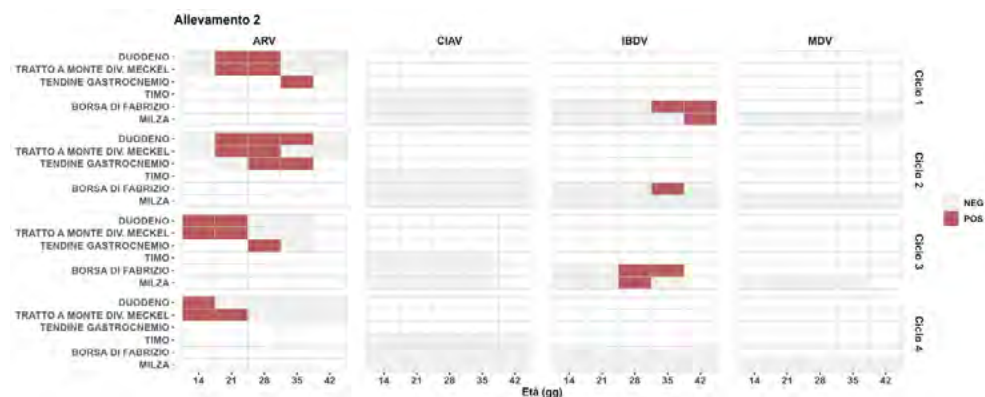


Figura 2. Allevamento 2: rappresentazione grafica della rilevazione molecolare di Avian Reovirus (ARV), Chicken Anemia Virus (CAV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) e Marek's disease virus (MDV) in diversi tessuti e fasi di allevamento.



ARV si è rivelato l'agente virale di più frequente riscontro: presente in tutti i cicli di entrambi gli allevamenti, ma con pattern temporali eterogenei a seconda del ciclo. Nell'allevamento 1, durante il ciclo 1 ARV è stato rilevato dall'intestino precocemente (14 gg) e nuovamente nelle fasi tardive (35 e 42 gg). Nel ciclo 2 dello stesso allevamento ARV è stato rilevato a 14 e 21 gg, per poi non essere più riscontrato. Nel ciclo 3 ha mostrato un andamento differente, essendo stato rilevato da intestino solamente a 21 gg, mentre a 28 e 35 gg è stato rilevato dal tendine del gastrocnemio che si presentava emorragico ed edematoso. Nell'allevamento 2, ARV ha mostrato un profilo abbastanza coerente tra i primi due cicli produttivi, nei quali le positività da intestino si sono concentrate nelle età intermedie (da 21 a 35 gg), mentre nel ciclo 3 è stato rilevato da intestino solo a 14 e 21 gg e da tendine a 28 gg. Nel ciclo 4 è stato rilevato solamente da intestino a 14 e 21 gg.

IBDV è stato rilevato frequentemente e ha mostrato un pattern più costante tra cicli e allevamenti. Nell'allevamento 1, in tutti i cicli produttivi, IBDV è stato rilevato a partire da 28 giorni e fino alla fine dei cicli 1 e 2, fino a 35 gg nel 3. In tutti i casi i ceppi sono stati identificati come very virulent (vvIBDV). Nell'allevamento 2 la presenza di vvIBDV, è stata rilevata nei primi due cicli, ma mentre nel primo era presente dai 28 giorni sino alla fine del ciclo, nel secondo è stato rilevato solo nel campionamento effettuato a 35 gg. Nel terzo ciclo sono stati invece rilevati ceppi di origine vaccinale a 28 e 35 gg.

CIAV è stato rilevato nell'allevamento 1 nel 2° e 3° ciclo, in entrambi i casi a 42 gg.

Il virus della Malattia di Marek è stato individuato solo raramente (due cicli) nell'allevamento 1 e identificato come ceppo vaccinale.

Analisi sierologiche

Nei confronti di ARV, la sierologia evidenzia un quadro eterogeneo tra cicli e allevamenti, coerente con una circolazione non uniforme del virus nel corso del monitoraggio. Nell'allevamento 1, tutti i campioni risultano negativi nel ciclo 1, positivi nel ciclo 2, mentre nel ciclo 3 coesistono soggetti sieropositivi e sieronegativi. Nell'allevamento 2, la positività è diffusa alla totalità dei soggetti analizzati nei cicli 2 e 4, con valori spesso ampiamente superiori al cut-off, mentre nel ciclo 3 si osserva la presenza di alcuni soggetti negativi. Nel complesso, il dato sierologico è compatibile con quanto osservato virologicamente, dove ARV è stato rilevato in modo ricorrente in più cicli. La variabilità tra cicli suggerisce tuttavia differenze nella tempistica e/o nell'intensità dell'esposizione.

Per quanto riguarda gli anticorpi anti-IBDV, è stato evidenziato un profilo anticorpale dominato da una risposta molto diffusa verso IBDV, con positività del 100% per IBD VP2 ELISA e del 92,2% per IBD ELISA anticorpi totali. Nell'allevamento 1 i campioni sono positivi in modo consistente in tutti i cicli, sia con ELISA convenzionale, sia con VP2-ELISA. I valori osservati sono sempre superiori al cut-off e mostrano una variabilità inter-individuale contenuta, con livelli complessivamente elevati coerentemente con il frequente riscontro virologico di IBDV. Nell'Allevamento 2 la VP2-ELISA evidenzia positività diffusa, con valori sopra cut-off nella maggior parte dei soggetti e modesta variabilità tra individui. L'ELISA convenzionale mostra invece una distribuzione più eterogenea, con coesistenza di soggetti negativi/borderline e soggetti positivi.

I valori ELISA per CIAV risultano inferiori al cut-off nella quasi totalità dei soggetti in entrambi gli allevamenti e in tutti i cicli, senza evidenza di sieropositività. Solo nel ciclo 2 dell'allevamento 2 un singolo soggetto supera il cut-off. Questo dato suggerisce l'assenza di una risposta anticorpale di gruppo rilevabile verso CIAV nel periodo considerato. Tale evidenza deve tuttavia essere interpretata insieme ai risultati virologici, che indicano un riscontro molecolare limitato e prevalentemente tardivo di CIAV.

In entrambi gli allevamenti i titoli HI anti-NDV sono complessivamente bassi: al limite del-

le rilevabilità e piuttosto omogenei nell'allevamento 1, con una distribuzione leggermente più ampia nell'allevamento 2, ma sempre nella parte bassa del range. È inoltre emersa una discrepanza tra ELISA e HI: 52,9% di positivi in ELISA, ma solo 19,6% in HI, con titoli generalmente bassi.

DISCUSSIONE

Dai risultati preliminari ottenuti è emersa una circolazione consistente ed eterogenea di ARV e IBDV nei due allevamenti monitorati, con differenze sia tra gli allevamenti, sia tra cicli produttivi dello stesso sito.

ARV è un patogeno endemico nei sistemi avicoli, correlato ad un ampio spettro clinico che comprende tenosinovite/artrite, sindrome da rallentamento della crescita/malassorbimento, quadri enterici e manifestazioni sistemiche variabili (Pitcovski & Goyal, 2020). Negli ultimi anni è stato riportato un aumento nella frequenza di riscontro del virus e delle forme cliniche ad esso correlate (Franzo *et al.*, 2024). Sebbene la dinamica temporale di ARV osservata nei due allevamenti non sia sovrapponibile, appare coerente con un coinvolgimento primario e precoce dell'intestino. Il riscontro di ARV a livello intestinale già a 14 gg in oltre la metà dei cicli monitorati suggerisce un'esposizione molto precoce al virus, verosimilmente dovuta ad una forte pressione infettante ambientale, che potrebbe inoltre giustificare il riscontro anche in tempi successivi. L'evidenza di ARV coincide con le fasi nelle quali è stata riscontrata una maggiore frequenza di forme enteriche e difformità dei gruppi, suggerendo un suo ruolo patogenetico nella sindrome. È opportuno sottolineare che la compromissione intestinale nelle prime fasi di vita dei broiler è particolarmente critica, a causa del conseguente malassorbimento e poiché l'alterazione della permeabilità della mucosa intestinale può favorire un passaggio precoce di patogeni in circolo, con lo sviluppo di patologie che si manifestano con il progredire dell'età, come dimostrato dalla notevole frequenza di spondiliti da *Enterococcus cecorum* osservate in 5 dei 7 gruppi monitorati. Inoltre, è interessante notare il riscontro relativamente frequente (60% dei casi) di elevate cariche virali di ARV da tendine del gastrocemio in soggetti affetti da artrite tibiotarsometatarsica e/o artrosinovite, che supporta l'eziologia virale delle lesioni tendinee riscontrate. L'età alla quale sono state riscontrate le lesioni tendinee, a partire da 28 gg, è coerente con quanto riportato in letteratura circa l'insorgenza di artrite/tenosinovite da ARV (Pitcovski & Goyal, 2020). Seppur con differenze tra cicli e allevamenti, le indagini sierologiche hanno rilevato un'elevata sieroprevalenza complessiva, pari all'80,4%, in linea con la complessiva positività virologica ricorrente per ARV.

L'infezione da IBDV rappresenta uno dei modelli meglio documentati di immunosoppressione virale nel pollo, poiché colpisce selettivamente i linfociti B e provoca deplezione follicolare e alterazioni strutturali della borsa di Fabrizio, con effetti che possono manifestarsi anche in forma subclinica e influire sulle risposte vaccinali eterologhe. Infatti, l'infezione (o anche la vaccinazione per IBD in condizioni particolari) può ridurre la risposta anticorpale a vaccinazioni come NDV e IBV, soprattutto se si verifica nelle fasi precoci dello sviluppo immunitario (Sharma *et al.*, 2000; Eterradossi & Saif, 2020; Lupini *et al.*, 2020). Nel presente studio è stata rilevata una circolazione significativa di IBDV, con identificazione di ceppi ad elevata patogenicità (vvIBDV) in oltre la metà dei cicli monitorati, e in particolare in tutti i cicli dell'allevamento 1. È interessante notare come l'infezione da IBDV sia stata riscontrata nella fase centrale-tardiva del ciclo, nonostante si tratti di una finestra temporale nella quale gli animali dovrebbero mostrare una minore suscettibilità all'infezione (Eterradossi & Saif, 2020). Il mancato riscontro di lesioni macroscopiche alla borsa di Fabrizio tipicamente attribuibili a ceppi ad elevata patogenicità è coerente con la nota manifestazione subclinica delle infezioni da vvIBDV in popolazioni vaccinate, nelle quali non si manifesta con alta mortalità, ma piuttosto attraverso la predisposizione a patologie secondarie. Dal lato sierologico,

l'elevata positività per IBDV (ELISA convenzionale e VP2) nell'allevamento 1 è coerente con una forte stimolazione antigenica complessiva, che può includere sia la componente vaccinale, sia la componente di campo. Nell'allevamento 2, la non sovrapposibilità tra i risultati di ELISA VP2 e ELISA convenzionale è coerente con l'impiego di vaccini vettoriali che esprimono VP2 e con le differenze antigeniche tra kit (coating VP2 *vs* antigeni differenti), aspetto già riportato in letteratura (Lupini *et al.*, 2020).

CIAV è un virus immunodepressivo che colpisce principalmente i precursori ematopoietici e il timo, determinando anemia e immunosoppressione legata ai linfociti T soprattutto nei soggetti giovani. Infezioni più tardive possono risultare subcliniche, ma comunque associate a immunodepressione transitoria e aumentata suscettibilità ad altre patologie (Schat & van Santen, 2020). La presenza di CIAV è stata rilevata soltanto in due casi, entrambi a fine ciclo, nello stesso allevamento, ma con elevate cariche virali. In entrambi gli allevamenti la sierologia risulta complessivamente negativa (solo 6/51 sieri positivi) al momento del campionamento, seppur con un segnale molto marcato in un gruppo nel quale il virus non era stato rilevato. Tali rilievi suggeriscono che l'eventuale esposizione al virus possa essere stata tardiva, transitoria o non accompagnata da una robusta risposta anticorpale rilevabile, anche in relazione all'età al campionamento, ma anche che la circolazione di CIAV, per quanto più limitata, possa essere molto rilevante vista l'assenza di copertura vaccinale.

L'indagine per MDV non ha dato evidenza di ceppi di campo nei campioni analizzati, mentre sporadicamente sono stati rilevati ceppi vaccinali (Rispens). Tuttavia, permane l'importanza di proseguire il monitoraggio, poiché interazioni tra vaccinazione, esposizioni subcliniche e co-infezioni possono influenzare la risposta immunitaria.

Infine, è opportuno evidenziare come, dalla sierologia, sia emersa una risposta anticorpale eterogenea nei confronti di NDV nonostante la vaccinazione, che potrebbe in parte derivare anche da interferenza dovute ai patogeni immunodepressivi rilevati nel corso dello studio. Considerando l'attuale situazione epidemiologica per NDV, questo dato evidenzia la sostanziale recettività dei gruppi di broiler esaminati alla malattia e la necessità di revisione delle pratiche vaccinali in questa categoria.

L'integrazione dei risultati virologici con i dati produttivi suggerisce che le positività rilevate mediante PCR documentino la circolazione di diversi agenti virali nei gruppi monitorati, ma non siano sufficienti, da sole, a spiegare in modo lineare le differenze di mortalità osservate tra cicli. L'analisi stratificata per allevamento ha evidenziato infatti pattern diversi. Nell'allevamento 1, il secondo e terzo ciclo si sono distinti dal primo per una mortalità maschile più elevata, soprattutto nella fase finale del ciclo produttivo. In questo allevamento, la positività per CIAV nei cicli 2 e 3 rappresenta il segnale virologico più coerente con il peggioramento osservato, poiché assente nel ciclo 1, caratterizzato da mortalità maschile più contenuta. Tuttavia, il rilievo tardivo di CIAV limita la possibilità di attribuire a questo virus un ruolo causale diretto e suggerisce piuttosto di interpretarlo come possibile indicatore di circolazione virale, immunosoppressione o maggiore vulnerabilità del gruppo. Diversamente, nell'allevamento 2 non è emersa un'associazione altrettanto chiara con un singolo patogeno. ARV è stato rilevato in tutti i cicli e, pur essendo compatibile con le problematiche locomotorie osservate in alcuni gruppi, non discrimina tra cicli a mortalità elevata e cicli a mortalità più contenuta. IBDV di campo è stato rilevato esclusivamente nel ciclo 1, che ha mostrato la mortalità complessiva più elevata, suggerendo un possibile contributo del virus al quadro sanitario di quel ciclo. Nei cicli 2 e 3, al contrario, le positività rilevate erano riconducibili a virus di origine vaccinale e non indicano quindi una circolazione di IBDV di campo. Questo aspetto è rilevante perché la mortalità maschile è risultata elevata anche nel ciclo 2, in assenza di IBDV di campo, mentre il ciclo 3 ha mostrato una mortalità più contenuta. Questo andamento suggerisce che IBDV possa aver avuto un ruolo contributivo in specifici cicli, ma non rappresenti un determinante unico delle differenze produttive osservate.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano la diffusione di agenti virali immunodepressivi, in particolare ARV e IBDV, nei sistemi intensivi di allevamento del pollo da carne e suggeriscono un possibile ruolo di tali agenti nel determinare fenomeni immunodepressivi subclinici. Tuttavia, la tempistica della positività, la persistenza dell'infezione, la presenza di coinfezioni e il contesto clinico-gestionale appaiono elementi più informativi rispetto ai dati analitici grezzi. Pertanto, i risultati ottenuti dalle analisi effettuate nel corso dello studio devono essere interpretati come evidenza di esposizione o circolazione virale all'interno dei gruppi monitorati, mentre l'attribuzione di un ruolo causale nelle differenze di performance richiede un approccio integrato che comprenda i dati clinici, anatomo-patologici e produttivi. Questi riscontri supportano l'ipotesi di un'interferenza immunitaria multifattoriale nei cicli esaminati. Per confermare questa ipotesi, nelle fasi successive dello studio è previsto il monitoraggio di ulteriori allevamenti e l'integrazione dei risultati con l'esame istologico degli organi linfoidi e la valutazione dello stato immunologico degli animali, al fine di determinare il reale impatto funzionale dei virus indagati sul sistema immunitario degli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. Etarradossi N and YM Saif. (2020). Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE (Ed.), Diseases of Poultry, 14th Edition, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, pp. 257-283.
2. Franzo G, Tucciarone CM, Faustini G, Poletto F, Baston R, Cecchinato M and M Legnardi. (2024). Reconstruction of Avian Reovirus History and Dispersal Patterns: A Phylodynamic Study. *Viruses*. 16: 796.
3. Gimeno IM and KA Schat. (2018). Virus-Induced Immunosuppression in Chickens. *Avian Dis.* 62:272-285.
4. Lupini C, Quaglia G, Mescolini G, Russo E, Salaroli R, Forni M, Boldini S and E. Catelli. (2020). Alteration of immunological parameters in infectious bronchitis vaccinated-specific pathogen-free broilers after the use of different infectious bursal disease vaccines. *Poult Sci.* 99: 4351-4359.
5. Pitcovski J and SM Goyal. (2020). Avian Reovirus Infections. In: Swayne DE (Ed.), Diseases of Poultry, 14th Edition, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, pp. 382-400.
6. Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S and HY Yeh. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol.* 24: 223-235.
7. Schat KA and VL van Santen. (2020). Chicken Infectious Anemia and Circovirus Infections in Commercial Flocks. In: Swayne DE (Ed.), Diseases of Poultry, 14th Edition, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, pp. 284-320.
8. Schat KA and MA Skinner. (2022). Avian immunosuppressive diseases and immune evasion. In: Kaspers B, Schat KA, Göbel TW, Vervelde L (Eds.), *Avian Immunology*, 3rd Edition, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 387-417.
9. Tang Y, Lin L, Sebastian A and H Lu. (2016). Detection and characterization of two co-infection variant strains of avian orthoreovirus (ARV) in young layer chickens using next-generation sequencing (NGS). *Sci Rep.* 6:24519.

PRIMA SEGNALEZIONE DI *STARLINGPOX VIRUS* IN PASSERI-FORMI INANELLATI IN ITALIA

Graziosi G.¹, Pace A.², Sapio M.², Dipineto L.², Lupini C.¹, Tomasoni R.¹, Tatino F.³, Motta A.³, Santaniello A.², Catelli E.¹, Fioretti A.², Borrelli L.²

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

²*Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli*

³*Associazione Studi Ornitologici Italia Meridionale (A.S.O.I.M.), San Giorgio a Cremano (NA)*

Summary

Avianpox viruses (APVs) are widespread DNA viruses affecting wild and domestic birds. This study reports the detection and isolation of APV from wild sparrows in Southern Italy, representing the first description of Starlingpox virus subclade B2 in Italy. During bird-ringing sessions in September 2025, 66 passerines were clinically examined, and APV-like lesions were observed in 13 Eurasian tree sparrows (*Passer montanus*) and one Italian sparrow (*Passer italiae*). Five lesion samples were PCR-positive for the p4b gene and identical sequences clustered within subclade B2. Viral isolation in embryonated chicken eggs produced chorioallantoic membrane lesions and histological changes consistent with APV infection. These findings indicate local circulation of a previously unreported APV subclade and support broader surveillance at the wild-captive bird interface.

INTRODUZIONE

Gli avipoxvirus (APV), appartenenti al genere Avipoxvirus, famiglia Poxviridae, sono virus a DNA a doppio filamento ampiamente diffusi negli uccelli selvatici e domestici (Boyle, 2007; Tripathy & Reed, 2020). L'infezione può manifestarsi in forma cutanea, difterica o, più raramente, sistemica, con gravità variabile in funzione della specie ospite, della virulenza del ceppo, della localizzazione delle lesioni e di eventuali fattori predisponenti (van Riper III & Forrester, 2007; Tripathy & Reed, 2020).

Gli APV sono stati descritti in numerose specie aviarie e sono classificati in diversi cladi e sottocladi sulla base del gene p4b (Lüschow *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2021; McInnes *et al.*, 2023). La trasmissione avviene principalmente tramite artropodi ematofagi, ma può verificarsi anche per contatto diretto o indiretto con animali infetti o fomite contaminati (Kligler *et al.*, 1929; van Riper III & Forrester, 2007; Lee *et al.*, 2017). In Italia sono stati precedentemente segnalati APV appartenenti a diverse sottocladi in uccelli domestici, selvatici e detenuti in cattività; tuttavia, non era ancora stata descritta la presenza di Starlingpox virus sottoclade B2 (Rampin *et al.*, 2007; Manarolla *et al.*, 2010; Lecis *et al.*, 2017; Di Francesco *et al.*, 2019). Il presente studio descrive l'identificazione, la caratterizzazione molecolare e l'isolamento di APV in passeriformi inanimati in Campania.

MATERIALI E METODI

Le attività di campionamento sono state condotte durante sessioni di inanellamento svolte nel settembre 2025 presso il Parco archeo-fluviale di Longola, Poggiomarino (Napoli). Gli uccelli sono stati catturati mediante *mist-net* da inanellatori autorizzati ISPRA, identificati a livello di specie, sottoposti a breve esame clinico e successivamente rilasciati, in accordo con le linee guida per l'utilizzo degli uccelli selvatici nella ricerca (Fair *et al.*, 2023). La presenza di lesioni cutanee compatibili con APV è stata valutata con particolare attenzione alle

aree non piumate, incluse palpebre, becco, capo, zampe e dita; le lesioni sono state inoltre classificate mediante scala semiquantitativa 0-4 (McGraw *et al.*, 2022). In presenza di lesioni macroscopicamente evidenti, il materiale patologico è stato raccolto con tamponi sterili e conservato in PBS addizionato con antibiotici e antimicotici. Dopo estrazione del DNA, i campioni sono stati analizzati mediante PCR diretta al gene p4b, seguita da sequenziamento Sanger bidirezionale degli ampliconi positivi (Lee & Lee, 1997). Le sequenze ottenute sono state assemblate, allineate con sequenze omologhe disponibili in GenBank mediante MAF-FT e analizzate mediante inferenza filogenetica *maximum-likelihood* con IQ-TREE (Katoh & Standley, 2013; Trifinopoulos *et al.*, 2016; Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). L'isolamento virale è stato eseguito inoculando un campione PCR-positivo su membrana corioallantoidea (CAM) di uova embrionate di pollo *specific-pathogen free* (SPF) di 10 giorni (Dufour-Zavala, 2008).

RISULTATI

Nel complesso sono stati esaminati 66 passeriformi, tutti classificati come giovani dell'anno. Lesioni cutanee compatibili con APV sono state osservate in 14 soggetti (21,2%): 13 passere mattuge (*Passer montanus*) e un passero d'Italia (*Passer italiae*). Le lesioni sono state rilevate in tutte le sessioni di inanellamento, con proporzioni comprese tra 11,1% e 25% nelle passere mattuge; l'unico passero d'Italia catturato presentava lesioni. Le sedi maggiormente interessate erano le zampe, seguite dalle ali; in alcuni soggetti le lesioni coinvolgevano più distretti anatomici, inclusi becco, regione perioculare e zampe (Figura 1). Non sono stati osservati evidenti segni clinici sistemici durante l'esame effettuato sul campo.

Figura 1. *Passer montanus* giovane dell'anno con lesioni APV-like multifocali (a-d) compatibili con la forma cutanea di vaiolo aviare.



Cinque campioni, raccolti da quattro passere mattuge e da un passero d'Italia, sono risultati positivi alla PCR per il gene p4b. Le sequenze parziali ottenute (552 bp), depositate in GenBank con numeri di accesso PZ162752-PZ162756, sono risultate identiche tra loro e hanno mostrato il 100% di identità nucleotidica con APV precedentemente rilevati in uccelli selvatici o mantenuti in cattività in Portogallo, Marocco e Giappone (Henriques *et al.*, 2016; Le Loc'h *et al.*, 2014; Pérez-Tris *et al.*, 2011; Terasaki *et al.*, 2010). L'analisi filogenetica ha collocato i virus identificati all'interno della sottoclade B2 (Figura 2).

Le CAM inoculate hanno mostrato ispessimento diffuso; l'esame istologico ha evidenziato degenerazione balloniforme delle cellule epiteliali e corpi inclusi eosinofili intracitoplasmatici, compatibili con infezione da APV (Figura 3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati documentano la prima identificazione di APV sottoclade B2 in Italia in Passeriformi inanellati in provincia di Napoli. Le lesioni osservate erano coerenti con la forma cutanea di vaiolo aviario, la manifestazione più frequentemente descritta negli uccelli selvatici (van Riper III & Forrester, 2007). La presenza di lesioni in una quota relativamente elevata di soggetti e in sessioni consecutive suggerisce una circolazione locale del virus durante il periodo di studio. Inoltre, l'identificazione di sequenze identiche in *Passer montanus* e *Passer italiae* indica la possibile circolazione della stessa variante virale tra specie simpatriche che condividono habitat, siti di alimentazione e rifugio; tale ipotesi è coerente con la tendenza di specie simili per tassonomia, dimensioni corporee e comportamento alimentare ad associarsi in gruppi misti (Sridhar *et al.*, 2012; Fülöp *et al.*, 2022). Il riscontro in soggetti giovani dell'anno supporta l'ipotesi di un'infezione acquisita localmente e di una circolazione attiva nella popolazione selvatica e/o nell'ambiente circostante. La comparsa dei casi a fine estate è inoltre compatibile con la stagionalità degli artropodi ematofagi, potenziali vettori meccanici degli APV (Akey *et al.*, 1981; Forrester, 1990). Sebbene non sia stato indagato un collegamento epidemiologico diretto, la presenza nell'area di attività di allevamento e mantenimento di passeriformi ornamentali potrebbe rappresentare un ulteriore elemento rilevante per la persistenza e la diffusione del virus all'interfaccia tra uccelli selvatici e quelli allevati in cattività come gli uccelli da gabbia e voliera.

Questo studio amplia le conoscenze sulla diversità degli APV in Europa e segnala per la prima volta la circolazione di Starlingpox virus sottoclade B2 in Italia. L'integrazione di sorveglianza molecolare, indagini patologiche, dati ecologici e informazioni sulle attività antropiche locali potrà contribuire a chiarire le dinamiche di mantenimento e trasmissione degli APV e a orientare misure di monitoraggio e biosicurezza mirate all'interfaccia tra avifauna selvatica e uccelli allevati e detenuti in cattività.

Figura 2. Albero filogenetico del frammento del gene p4b: gli APV identificati in *Passer montanus* e *Passer italiae* si collocano nella sottoclade B2.

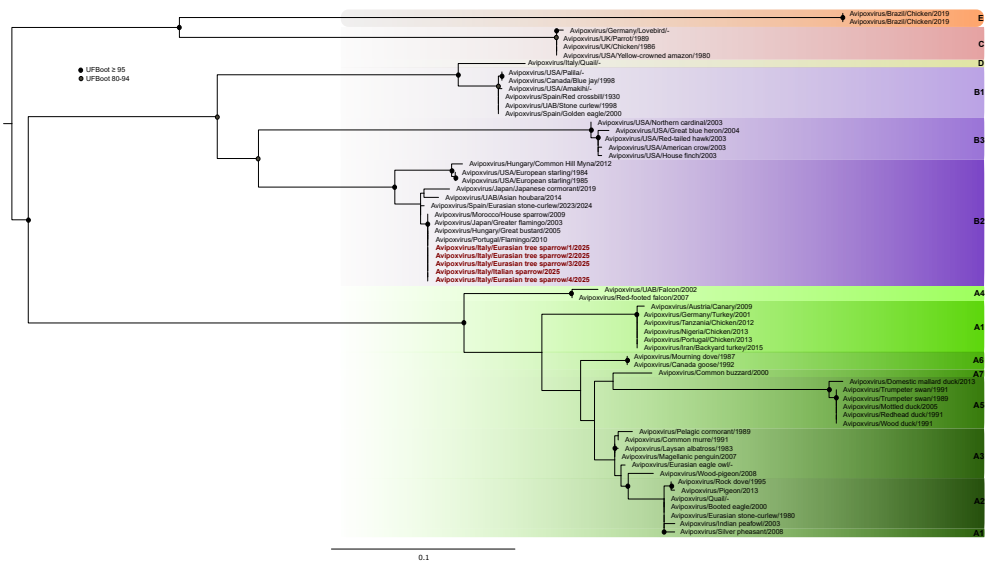
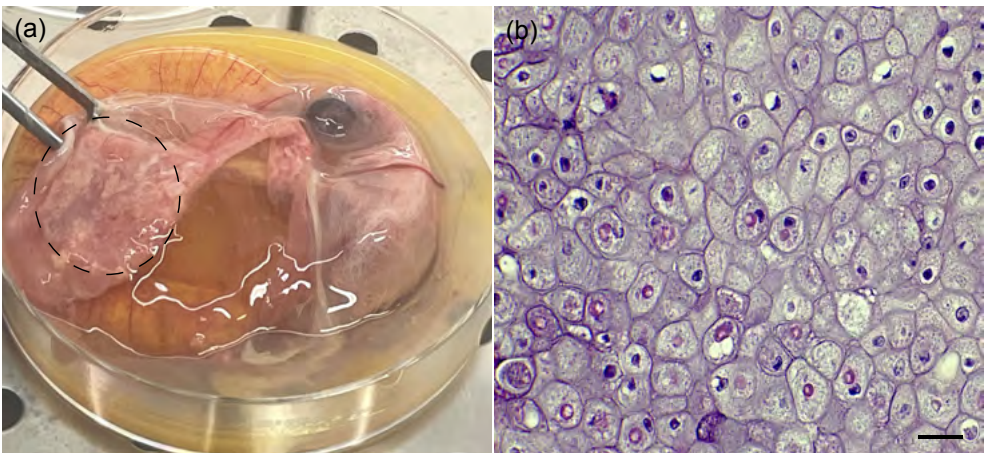


Figura 3. Embrione di pollo SPF inoculato con APV. Ispessimento e opacità della CAM (a), degenerazione balloniforme dell'epitelio e corpi inclusi eosinofili intracitoplasmatici (b).



BIBLIOGRAFIA

1. Akey, B. L., Nayar, J. K., & Forrester, D. J. (1981). Avian pox in Florida wild turkeys: *Culex nigripalpus* and *Wyeomyia vanduzeei* as experimental vectors. *J Wildl Dis*, 17, 597-599.
2. Boyle, D. B. (2007). Genus Avipoxvirus. In Mercer, A. A., Schmidt, A., & Weber, O. (Eds.), *Poxviruses* (pp. 217-251). Basel, Switzerland: Springer.
3. Di Francesco, C. E., Profeta, F., Romanucci, M., Zuccarini, R., Altea, T., Malatesta, D., Della Salda, L., & Marsilio, F. (2019). Evidence of avian poxvirus and papillomavirus infection in *Gyps fulvus* in Italy. *Arch Virol*, 164, 291-295.
4. Dufour-Zavala, L. (2008). *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*. Jacksonville, Florida, USA: American Association of Avian Pathologists.
5. Fair, J., Paul, J., Jones, J., & Bies, L. (2023). *Guidelines to the Use of Wild Birds in Research*. Washington, D.C., USA: Ornithological Council.
6. Forrester, D. (1990). The ecology and epizootiology of avian pox and malaria in wild turkeys. *Bull Soc Vector Ecol*, 16, 127-148.
7. Fülöp, A., Németh, Z., Kocsis, B., Deák-Molnár, B., Bozsoky, T., Kómvés, G., & Barta, Z. (2022). Fighting ability, personality and melanin signalling in free-living Eurasian tree sparrows. *PeerJ*, 10, e13660.
8. Henriques, A. M., Fagulha, T., Duarte, M., Ramos, F., Barros, S. C., Luís, T., Bernardino, R., Fernandes, T. L., Lapão, N., da Silva, J. F., & Fevereiro, M. (2016). Avian poxvirus infection in a flamingo of the Lisbon zoo. *J Zoo Wildl Med*, 47, 161-174.
9. Kalyanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*, 14, 587-589.
10. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30, 772-780.
11. Kligler, I. J., Muckenfuss, R. S., & Rivers, T. M. (1929). Transmission of fowl-pox by mosquitoes. *J Exp Med*, 49, 649-660.
12. Le Loc'h, G., Ducatez, M. F., Camus-Bouclainville, C., Guérin, J. L., & Bertagnoli, S. (2014). Diversity of avipoxviruses in captive-bred Houdouard bustard. *Vet Res*, 45, 98.
13. Lecis, R., Secci, F., Antuofermo, E., Nuvoli, S., Scagliarini, A., Pittau, M., & Alberti, A. (2017). Multiple gene typing and phylogeny of avipoxvirus in a stone curlew. *Vet Res Commun*, 41, 77-83.
14. Lee, H. R., Koo, B. S., Kim, J. T., Kim, H. C., Kim, M. S., Klein, T. A., Shin, M. S., Lee, S., Jeon, E. O., Min, K. C., Lee, S. B., Bae, Y., & Mo, I. P. (2017). Molecular epidemiology of avian poxvirus in turtle doves and biting midges. *J Wildl Dis*, 53, 749-760.
15. Lee, L. H., & Lee, K. H. (1997). Application of PCR for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J Virol Methods*, 63, 113-119.
16. Lüscho, D., Hoffmann, T., & Hafez, H. M. (2004). Differentiation of avian poxvirus strains based on 4b gene sequences. *Avian Dis*, 48, 453-462.
17. Manarolla, G., Pisoni, G., Sironi, G., & Rampin, T. (2010). Molecular characterization of avian poxvirus strains from different avian species. *Vet Microbiol*, 140, 1-8.
18. McGraw, K. J., Aguiar de Souza Penha, V., Drake, D. J., Kraberger, S., & Varsani, A. (2022). Poxvirus infection in house finches. *Transbound Emerg Dis*, 69, e2318-e2328.
19. McInnes, C. J., Damon, I. K., Smith, G. L., McFadden, G., Isaacs, S. N., Roper, R. L., Evans, D. H., Damaso, C. R., Carulei, O., Wise, L. M., & Lefkowitz, E. J. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Poxviridae 2023. *J Gen Virol*, 104.

20. Pérez-Tris, J., Williams, R. A., Abel-Fernández, E., Barreiro, J., Conesa, J. J., Figuerola, J., Martínez-Martínez, M., Ramírez, A., & Benítez, L. (2011). Multiplex PCR for poxvirus and papillomavirus in cutaneous warts from live birds and museum skins. *Avian Dis*, 55, 545-553.
21. Rampin, T., Pisoni, G., Manarolla, G., Gallazzi, D., & Sironi, G. (2007). Epornitic of avian pox in common buzzards (*Buteo buteo*): virus isolation and molecular biological characterization. *Avian Pathol*, 36, 161-165.
22. Sridhar, H., Srinivasan, U., Askins, R. A., Canales-Delgadillo, J. C., Chen, C.-C., Ewert, D. N., Gale, G. A., Goodale, E., Gram, W. K., & Hart, P. J. (2012). Positive relationships between association strength and phenotypic similarity characterize the assembly of mixed-species bird flocks worldwide. *Am Nat*, 180, 777-790.
23. Terasaki, T., Kaneko, M., & Mase, M. (2010). Avian poxvirus infection in flamingos (*Phoenicopterus roseus*) in a zoo in Japan. *Avian Dis*, 54, 955-957.
24. Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool. *Nucleic Acids Res*, 44, W232-W235.
25. Tripathy, D. N., & Reed, W. M. (2020). Pox. In Swayne, D. E. *et al.* (Eds.), *Diseases of Poultry*, 14th ed., Wiley-Blackwell, pp. 364-381.
26. Van Riper III, C., & Forrester, D. J. (2007). Avian pox. In Thomas, N. J., Hunter, D. B., & Atkinson, C. T. (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Birds*, Blackwell Publishing, pp. 131-176.
27. Williams, R. A. J., Truchado, D. A., & Benítez, L. (2021). Prevalence of poxvirus disease in free-living and captive wild birds. *Microbiol Res*, 12, 403-418.

SORVEGLIANZA AEROBIOLOGICA DI PATOGENI E GENI DI RESISTENZA ANTIMICROBICA NEGLI ALLEVAMENTI AVICOLI: UN APPROCCIO ONE HEALTH

Catania A.M.¹, Ioakeimidou M.¹, Stella M.C.¹, Scagliotti P.F.², Gavazzi L.³, Castellina C.⁴, Grego E.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco (TO), Italia;*

² *ASL Casale, Italia;*

³ *Amadori, Italia;*

⁴ *Incubatoio Aglietto Natura, Bianzè (VC), Italia.*

Summary

Environmental surveillance is increasingly recognized as a key component of One Health strategies aimed at monitoring infectious agents and antimicrobial resistance determinants in livestock production systems. In intensive poultry farming, bioaerosols and environmental matrices may contribute to the circulation and environmental dissemination of pathogens, bacteria and antimicrobial resistance genes. This study evaluated the applicability of an integrated aerobiological and environmental sampling approach in the external environment surrounding a poultry breeder farm. Air, litter, soil and broad-leaf vegetation samples were collected and analysed using molecular methods. Viral RNA was investigated by real-time RT-PCR targeting Influenza A virus, while DNA from environmental samples was analysed for selected antimicrobial resistance genes using multiplex PCR coupled with xTAG® Luminex technology. Molecular results showed the detection of Influenza A viral RNA in litter, broad-leaf vegetation and bioaerosol collected immediately outside the farm fence. In addition, external poultry bioaerosol samples confirmed the detection of the sulfonamide resistance gene *sul1*, while *sul2*, *sul3* and *sul4* were not detected. These findings support the potential value of aerobiological and environmental sampling as a non-invasive tool for integrated One Health surveillance in poultry production systems.

INTRODUZIONE

L'approccio One Health riconosce la stretta interconnessione tra salute animale, salute umana e ambiente, promuovendo sistemi di sorveglianza integrati in grado di monitorare simultaneamente la circolazione di agenti patogeni e determinanti di resistenza antimicrobica (Adisasmito et al., 2022). In questo contesto, l'ambiente rappresenta un elemento chiave nella diffusione di microrganismi e materiale genetico, costituendo un'interfaccia dinamica tra allevamento, ecosistemi circostanti e popolazione umana.

L'antimicrobico-resistenza rappresenta una delle principali minacce sanitarie globali e coinvolge contemporaneamente uomo, animali e ambiente (WHO, 2023). Gli allevamenti avicoli intensivi possono costituire ecosistemi complessi nei quali animali, lettiera, deiezioni, polveri organiche e sistemi di ventilazione contribuiscono alla formazione e alla dispersione di bioaerosol. Quest'ultimo può contenere batteri, virus, frammenti cellulari, DNA microbico e geni di resistenza antimicrobica, rendendo il comparto aereo una matrice di crescente interesse per la sorveglianza ambientale (Zhao et al., 2014; Bai et al., 2022; Luiken et al., 2020).

Il campionamento aerobiologico consente di valutare la presenza di materiale biologico aerodisperso in modo non invasivo, senza interferire direttamente con gli animali e con la

possibilità di ottenere informazioni rappresentative dell'ambiente produttivo (Zhao et al., 2014). Tale approccio risulta particolarmente utile in ambito avicolo, dove l'elevata densità animale, la presenza di lettiera e i sistemi di ventilazione possono favorire la mobilitazione di particelle biologiche e la loro dispersione nell'ambiente esterno.

Oltre al bioaerosol, anche matrici ambientali quali lettiera, terreno e vegetazione possono fornire indicazioni utili sulla contaminazione biologica dell'ecosistema di allevamento. La lettiera rappresenta una matrice strettamente associata agli animali e alle loro deiezioni, mentre il terreno e la vegetazione circostante possono riflettere la deposizione di particelle aerodisperse e la possibile persistenza di materiale genetico nell'ambiente esterno.

Lo sviluppo di metodiche molecolari ad elevata sensibilità consente oggi di integrare, sugli stessi campioni ambientali, la ricerca di differenti target biologici (Dunbar, 2006; Laconi et al., 2020). La real-time RT-PCR permette la rilevazione rapida e specifica di RNA virale (Laconi et al., 2020; WOA, 2024), mentre la tecnologia multiplex PCR/xTAG® Luminex consente l'identificazione simultanea di più geni di resistenza antimicrobica, offrendo la possibilità di caratterizzare il resistoma ambientale associato agli allevamenti avicoli (Dunbar, 2006; Luiken et al., 2020).

Nel presente studio è stato applicato un protocollo di sorveglianza ambientale mediante campionamento di bioaerosol, lettiera, terreno e vegetazione in prossimità di un allevamento avicolo di riproduttori. Il contesto di campionamento era rappresentato da un'area interessata dalla gestione di un focolaio confermato di influenza aviaria ad alta patogenicità. Tale situazione ha consentito di valutare la presenza di RNA virale in differenti matrici ambientali e, parallelamente, di applicare un approccio molecolare per la ricerca dei principali geni di resistenza antimicrobica, con particolare riferimento ai geni di resistenza ai sulfamidici.

L'obiettivo del lavoro è stato valutare la fattibilità di un approccio integrato di sorveglianza ambientale e aerobiologica finalizzato alla ricerca di acidi nucleici virali e geni di resistenza antimicrobica nelle matrici ambientali degli allevamenti avicoli, quale modello applicativo di sorveglianza in ottica One Health.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio è stato condotto nell'ambito di un programma di sorveglianza ambientale applicato ad un allevamento avicolo di riproduttori e all'area esterna circostante. Il protocollo di campionamento è stato sviluppato con l'obiettivo di valutare la presenza di materiale biologico in differenti matrici ambientali e di integrare, sugli stessi campioni, la ricerca di RNA virale e geni di resistenza antimicrobica. Non sono riportati codici aziendali o ulteriori dettagli identificativi dei siti campionati.

Sono state raccolte differenti matrici ambientali rappresentative dei principali comparti coinvolti nella possibile diffusione di materiale biologico: bioaerosol esterno, lettiera, terreno superficiale e foglie di vegetazione spontanea, con particolare attenzione a piante a foglia larga.

Il campionamento è stato effettuato in prossimità dell'allevamento e lungo un gradiente spaziale nell'ambiente esterno. I campioni di bioaerosol sono stati raccolti immediatamente all'esterno della recinzione dell'allevamento e in ulteriori punti ambientali selezionati. Le matrici solide sono state raccolte in contenitori sterili e trasportate in laboratorio per le successive analisi molecolari.

Campionamento aerobiologico

Il campionamento del bioaerosol è stato effettuato mediante dispositivo AeroCollect®, sistema portatile di campionamento attivo dell'aria basato sulla cattura elettrostatica delle particelle biologiche aerodisperse. Il dispositivo consente di aspirare un volume noto di aria all'interno di una camera di raccolta monouso, nella quale un campo elettrostatico permette di trattenere particelle microscopiche presenti nel bioaerosol, inclusi batteri, virus, frammenti cellulari e materiale genetico.

Il dispositivo è stato utilizzato nell'ambiente esterno all'allevamento, mantenendo condizioni operative standardizzate. I campioni aerobiologici sono stati raccolti in prossimità delle aree di interesse, con particolare attenzione all'area immediatamente esterna alla recinzione aziendale. Al termine del campionamento, le camere di raccolta sono state conservate in condizioni idonee fino alla processazione in laboratorio.

Preparazione dei campioni ed estrazione degli acidi nucleici

I campioni di bioaerosol raccolti mediante AeroCollect® sono stati sottoposti a eluizione utilizzando acqua sterile molecolare. Il volume di eluizione è stato fatto circolare all'interno della camera di raccolta al fine di recuperare il materiale biologico trattenuto durante il campionamento. L'eluato ottenuto è stato trasferito in microprovette sterili e conservato a -80 °C fino alle successive analisi.

Per le matrici ambientali solide, comprendenti lettiera, terreno e foglie, è stata effettuata l'estrazione degli acidi nucleici mediante protocolli di biologia molecolare idonei alla tipologia di matrice. Il DNA totale estratto è stato destinato alla ricerca dei geni di resistenza antimicrobica, mentre l'RNA estratto dalle matrici selezionate è stato utilizzato per la ricerca dell'RNA virale mediante real-time RT-PCR.

Ricerca dell'RNA virale

La ricerca dell'RNA del virus dell'influenza aviaria di tipo A è stata eseguita mediante real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time RT-PCR), secondo un approccio ampiamente utilizzato nella diagnostica dell'influenza aviaria (Laconi et al., 2020; WOA, 2024). L'analisi è stata condotta utilizzando un protocollo diagnostico validato basato sull'amplificazione del gene della proteina di matrice (gene M), comunemente impiegato come test di screening per la rilevazione dei virus influenzali di tipo A (WOA, 2024).

È importante sottolineare che tale metodica consente esclusivamente la rilevazione di RNA virale e non permette di dimostrare la presenza di particelle virali vitali o infettanti. Pertanto, i risultati ottenuti sono stati interpretati come evidenza della presenza di acidi nucleici virali nelle matrici ambientali analizzate.

Ricerca dei geni di resistenza antimicrobica

Il DNA estratto dai campioni ambientali è stato analizzato mediante PCR multiplex seguita da identificazione dei target genetici attraverso tecnologia xTAG® Luminex (Dunbar, 2006). Tale metodica consente la rilevazione simultanea di più target molecolari in un'unica seduta analitica, mediante l'impiego di primer specifici, sequenze TAG e microsfeere MagPlex®-TAG associate a lettura fluorimetrica.

In questa fase del lavoro, l'attenzione è stata rivolta in particolare ai geni di resistenza ai sulfamidici: sul1, sul2, sul3 e sul4. Tali geni codificano per varianti della diidropteroato sintetasi meno sensibili all'azione dei sulfamidici e rappresentano determinanti genetici di interesse per lo studio della diffusione dell'antimicrobico-resistenza negli ecosistemi zootecnici (Rådström et al., 1991; Razavi et al., 2017; Catania et al., 2024).

I risultati sono stati interpretati in funzione della matrice campionata, con particolare riferimento al bioaerosol esterno, al fine di valutare l'applicabilità del campionamento aerobiologico ambientale come strumento di sorveglianza non invasiva dei geni di resistenza antimicrobica.

Analisi dei dati

I risultati ottenuti mediante real-time RT-PCR sono stati valutati in relazione alla matrice ambientale campionata e alla posizione del punto di prelievo. L'obiettivo era descrivere la distribuzione spaziale dell'RNA virale rilevabile nelle matrici ambientali, senza formulare conclusioni sulla vitalità o infettività delle particelle virali eventualmente presenti.

I risultati relativi ai geni di resistenza antimicrobica sono stati interpretati come dati di fattibilità della piattaforma AeroCollect®/xTAG® Luminex per il monitoraggio del resistoma nel bioaerosol esterno degli allevamenti avicoli.

RISULTATI

Il protocollo di sorveglianza ambientale ha consentito il campionamento di bioaerosol, lettiera, terreno e vegetazione mediante un approccio integrato finalizzato alla ricerca di RNA virale e geni di resistenza antimicrobica.

Le analisi effettuate mediante real-time RT-PCR hanno evidenziato la presenza di RNA del virus dell'influenza aviaria di tipo A nella lettiera. Tale riscontro documenta la presenza di acidi nucleici virali nella principale matrice ambientale associata agli animali e alle loro deiezioni.

Ulteriori positività molecolari sono state osservate in campioni di vegetazione a foglia larga e nel bioaerosol raccolto immediatamente all'esterno della recinzione dell'allevamento. Questi risultati indicano la presenza di RNA virale rilevabile anche in matrici ambientali esterne all'area di stabulazione.

Le restanti matrici ambientali raccolte lungo il gradiente spaziale sono attualmente in fase di processamento. Il completamento delle analisi consentirà di descrivere la distribuzione spaziale dell'RNA virale rilevabile nelle matrici ambientali, fornendo indicazioni sulla distribuzione degli acidi nucleici virali nell'ambiente circostante l'allevamento.

Parallelamente, i dati ottenuti mediante campionamento del bioaerosol esterno con dispositivo AeroCollect® hanno confermato la fattibilità della ricerca di geni di resistenza antimicrobica direttamente nei campioni aerobiologici ambientali.

L'analisi mediante tecnologia multiplex PCR/xTAG® Luminex ha evidenziato la presenza del solo gene sul1, mentre sul2, sul3 e sul4 non sono risultati rilevabili nei campioni di bioaerosol esterno analizzati. Tali risultati confermano l'applicabilità del campionamento aerobiologico ambientale quale strumento non invasivo per la sorveglianza dei determinanti genetici di resistenza antimicrobica negli allevamenti avicoli.

Le analisi dei geni di resistenza antimicrobica sulle ulteriori matrici ambientali raccolte nel presente studio, comprendenti lettiera, terreno e vegetazione, sono attualmente in corso e consentiranno di caratterizzare la distribuzione del resistoma ambientale in relazione alla presenza di RNA virale nelle stesse matrici.

DISCUSSIONE

L'approccio One Health richiede lo sviluppo di sistemi di sorveglianza in grado di integrare il monitoraggio della salute animale, dell'ambiente e della salute pubblica (Adisasmito et al., 2022). In questo contesto, la sorveglianza ambientale rappresenta uno strumento complementare ai tradizionali programmi di controllo sanitario, consentendo di valutare la presenza di agenti biologici e determinanti di resistenza antimicrobica senza ricorrere necessariamente al campionamento diretto degli animali (Bai et al., 2022; Luiken et al., 2020).

Nel presente studio, il campionamento di bioaerosol, lettiera, terreno e vegetazione ha permesso di applicare un protocollo integrato di monitoraggio ambientale basato sulla ricerca di RNA virale e, parallelamente, sulla caratterizzazione molecolare dei geni di resistenza antimicrobica.

Il riscontro di RNA del virus dell'influenza aviaria in differenti matrici ambientali documenta la presenza di acidi nucleici virali nell'ambiente circostante l'allevamento. È tuttavia importante sottolineare che la metodica di real-time RT-PCR utilizzata consente esclusivamente la rilevazione di RNA virale e non permette di dimostrare la presenza di particelle virali vitali o infettanti. Pertanto, i risultati devono essere interpretati come evidenza della distribuzione spaziale degli acidi nucleici virali nelle matrici ambientali investigate e non come dimostrazione della presenza di virus infettante.

La rilevazione di RNA virale nella lettiera appare coerente con il ruolo di questa matrice quale comparto strettamente associato agli animali, alle deiezioni e al materiale organico dell'allevamento. Il riscontro di RNA virale in campioni di vegetazione a foglia larga e nel bioaerosol esterno suggerisce invece l'utilità delle matrici ambientali come indicatori della presenza di acidi nucleici virali nell'ambiente circostante. La prosecuzione delle analisi consentirà di definire con maggiore precisione la distribuzione spaziale dell'RNA virale rilevabile nelle diverse matrici.

Parallelamente, i risultati ottenuti mediante campionamento aerobiologico esterno con dispositivo AeroCollect® confermano la possibilità di utilizzare il bioaerosol ambientale per la ricerca dei geni di resistenza antimicrobica. In particolare, la rilevazione del solo gene *sul1*, associata alla mancata identificazione di *sul2*, *sul3* e *sul4*, suggerisce che il bioaerosol possa rappresentare una matrice utile per la sorveglianza molecolare dell'antimicrobico-resistenza negli allevamenti avicoli.

Il gene *sul1* è frequentemente associato agli integroni di classe 1, elementi genetici mobili ampiamente diffusi tra batteri Gram-negativi di origine intestinale, inclusi membri della famiglia Enterobacteriaceae (Gillings, 2014; Poey et al., 2019). Negli allevamenti avicoli, la presenza di batteri enterici nella lettiera e nelle deiezioni può favorire la loro aerosolizzazione e la conseguente rilevazione di determinanti genetici di resistenza nel bioaerosol (Zhao et al., 2014; Luiken et al., 2020). La mancata rilevazione di *sul2*, *sul3* e *sul4* nei campioni aerobiologici esterni analizzati potrebbe essere correlata alla diversa distribuzione ecologica di questi geni, alla loro associazione con specifici elementi genetici mobili o alla bassa abbondanza nei campioni investigati (Rådström et al., 1991; Razavi et al., 2017; Catania et al., 2024).

L'elemento innovativo del presente lavoro risiede nell'integrazione delle due linee di indagine sul medesimo approccio di campionamento ambientale. La possibilità di utilizzare matrici ambientali esterne per la ricerca di acidi nucleici virali e geni di resistenza antimicrobica apre nuove prospettive per lo sviluppo di sistemi di sorveglianza ambientale multi-parametrici.

Il campionamento aerobiologico esterno presenta inoltre importanti vantaggi applicativi. Esso consente un monitoraggio non invasivo, riduce la necessità di accesso diretto agli animali e può essere ripetuto nel tempo con minore impatto operativo. Questo aspetto è particolarmente rilevante in contesti di emergenza sanitaria o di restrizioni legate alla biosicurezza, nei quali l'accesso agli allevamenti può essere limitato.

Nel complesso, i risultati ottenuti supportano l'impiego del bioaerosol e delle matrici ambientali quali strumenti integrativi per la sorveglianza degli allevamenti avicoli. Il completamento delle analisi sui campioni ancora in fase di processamento consentirà di approfondire la relazione tra distribuzione dell'RNA virale e presenza di geni di resistenza antimicrobica nelle diverse matrici, contribuendo allo sviluppo di modelli di sorveglianza ambientale in ottica One Health.

CONCLUSIONI

Il presente studio conferma l'applicabilità della sorveglianza ambientale quale supporto ai programmi di biosicurezza negli allevamenti avicoli.

L'integrazione del campionamento aerobiologico con l'analisi di differenti matrici ambientali consente di ottenere informazioni complementari sulla distribuzione degli acidi nucleici virali e dei geni di resistenza antimicrobica attraverso un approccio non invasivo e facilmente ripetibile.

I risultati evidenziano la presenza di RNA del virus dell'influenza aviaria in differenti matrici ambientali, quali lettiera, vegetazione a foglia larga e bioaerosol esterno alla recinzione dell'allevamento. Tali risultati devono essere interpretati come rilevazione di acidi nucleici virali e non come dimostrazione della presenza di virus infettante.

Il campionamento del bioaerosol esterno mediante AeroCollect® associato alla tecnologia xTAG® Luminex ha inoltre consentito la rilevazione del gene sul1, mentre sul2, sul3 e sul4 non sono risultati rilevabili nei campioni analizzati.

Il completamento delle analisi molecolari sulle ulteriori matrici ambientali consentirà di definire la distribuzione spaziale dell'RNA virale e del resistoma ambientale, contribuendo allo sviluppo di modelli innovativi di sorveglianza ambientale secondo i principi della One Health.

BIBLIOGRAFIA

1. Adisasmito W.B., Almuhairi S., Behravesch C.B., Bilivogui P., Bukachi S.A., Casas N., Cediël Becerra N., Charron D.F., Chaudhary A., Ciacci Zanella J.R., Cunningham A.A., Dar O., Debnath N., Dungu B., Farag E., Gao G.F., Hayman D.T.S., Khaitsa M., Koopmans M.P.G., Machalaba C., Mackenzie J.S., Markotter W., Mettenleiter T.C., Morand S., Smolenskiy V., Zhou L. (2022). One Health: A new definition for a sustainable and healthy future. *PLoS Pathogens*, 18(6): e1010537.

2. Bai L., Wang Y., Guo Y., et al. (2022). Bioaerosol as a potential route for the transmission of antibiotic resistance genes. *Environment International*, 168: 107483.
3. Catania A.M., Stella M.C., Cimino F., Zoppi S., Grego E. (2024). Sulfonamide resistance evaluation in five animal species and first report of sul4 in companion animals. *Veterinary Microbiology*, 296: 110170.
4. Dunbar S.A. (2006). Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta*, 363: 71-82.
5. Gillings M.R. (2014). Integrons: Past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(2): 257-277.
6. Laconi A., Fortin A., Bedendo G., Shibata A., Sakoda Y., Awuni J.A., Go-Maró E., Arafa A., Maken Ali A.S., Terregino C., Monne I. (2020). Detection of avian influenza virus: A comparative study of the in silico and in vitro performances of current RT-qPCR assays. *Scientific Reports*, 10: 8441.
7. Luiken R.E.C., Van Gompel L., Munk P., Sarrazin S., Joosten P., Dorado-García A., Borup Hansen R., Knudsen B.E., Bossers A., Wagenaar J.A., Aarestrup F.M., Dewulf J., Mevius D.J., Schmitt H., Heederik D.J.J., Smit L.A.M. (2020). Farm dust resistomes and bacterial microbiomes in European poultry and pig farms. *Environment International*, 143: 105971.
8. Poey M.E., Azpiroz M.F., Laviña M. (2019). On sulfonamide resistance, sul genes, class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 135: 103611.
9. Rådström P., Swedberg G., Sköld O. (1991). Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in Gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9): 1840-1848.
10. Razavi M., Marathe N.P., Gillings M.R., Flach C.F., Kristiansson E., Larsson D.G.J. (2017). Discovery of the fourth mobile sulfonamide resistance gene. *Microbiome*, 5: 160.
11. WHO (2023). Antimicrobial resistance. World Health Organization, Geneva.
12. WOAH (2024). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris.
13. Zhao Y., Aarmink A.J.A., De Jong M.C.M., Groot Koerkamp P.W.G. (2014). Airborne microorganisms from livestock production systems and their relation to dust. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44: 1071-1128.

VALUTAZIONE IN CAMPO DELL'EFFICACIA DI UN PRODOTTO FITOGENICO NEL CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI AVICOLA

Rapi M.C.¹, Tinti P.², Facchetti G.³, Ubaldi O.⁴, Filipe J.¹, Grilli G.¹

¹ Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali, Via dell'Università 6, Lodi.;

² Fitoterapy srl, Via Ercole Pietro Gherardi, 29 - 41123 - Modena;

³ Avicola Alimentare Monteverde, Via San Donato, 107 25038 Rovato (Bs);

⁴ Nutrizionista Libero Professionista.

Summary

Avian coccidiosis remains one of the leading causes of economic losses in poultry production, affecting performance directly and, indirectly, through enteric dysbiosis. Growing pressure to reduce the use of synthetic anticoccidials has stimulated interest in phytogenic alternatives, yet field data on specific essential oil combinations under natural infection conditions remain limited. This study evaluated, under field conditions, the efficacy of a phytogenic product based on cinnamon (*Cinnamomum cassia*), chili pepper (*Capsicum frutescens*) and ginger (*Zingiber officinale*), administered at 1.5 kg/t of feed, compared with a conventional anticoccidial protocol (nicarbazin, narasin, salinomycin) in a commercial Ross 308 broiler farm (n=24,650 and 24,600 birds, 2 houses/group). Fecal oocyst counts (McMaster technique) were determined at 21, 28, 35 and 42 days. Lesion scores (Johnson & Reid, 1970) were assessed in spontaneously deceased birds at the same time points. Body weight was recorded at 7, 21, 31 and 50 days. The treated group showed an earlier peak in oocyst excretion (28 vs 35 days) compared with the control, with no statistically significant differences between groups for oocyst counts (Mann-Whitney, $p=0.222$), lesion scores ($p=0.654$) or body weight (paired t-test, $p=0.861$). The phytogenic product showed no statistically significant differences compared with to the conventional program, with a pattern consistent with an immunomodulatory mechanism rather than direct parasitocidal action. Therefore, these findings should be interpreted as preliminary field evidence supporting the potential use of the phytogenic product rather than as proof of equivalence.

INTRODUZIONE

Nella moderna avicoltura, le diverse specie di coccidi incidono ancora in maniera rilevante sull'economia dell'allevamento, sia per i costi diretti legati all'infezione, sia per quelli indiretti connessi alla profilassi (Martins et al., 2022). Tra i principali effetti diretti della coccidiosi aviaria si riscontrano un ridotto incremento di peso giornaliero e un peggioramento dell'indice di conversione alimentare (FCR), fattori che si traducono in una maggiore variabilità all'interno del gruppo, in un peggioramento del benessere animale e in declassamenti qualitativi della produzione.

Tra le conseguenze indirette rientra la disbiosi enterica, caratterizzata da un'alterazione della diversità e della struttura del microbioma intestinale, con conseguente squilibrio dell'omeostasi intestinale. Questo squilibrio può predisporre alla proliferazione di agenti patogeni opportunisti, in particolare *Clostridium perfringens*, con ulteriori rischi per la salute generale e la produttività del gruppo (Pietruska et al., 2023). Inoltre, l'aumento dell'umidità della lettiera, associato alla disbiosi intestinale, rappresenta un fattore di rischio significativo per la pododermatite, una delle principali cause di declassamento qualitativo delle carcasse (Taira et al., 2014).

La profilassi si basa, oltre che su una gestione igienico-sanitaria ottimale dell'allevamento, sull'impiego di vaccini o sulla chemioprofilassi di routine, condotta tramite l'uso di composti anticoccidici. Questi si suddividono in due principali categorie: gli ionofori, derivati da prodotti di fermentazione, e le sostanze chimiche di sintesi, prodotte mediante sintesi chimica (Ahmad et al., 2024). Le difficoltà legate all'uso sistematico di farmaci e vaccini anticoccidici nei polli hanno però stimolato la ricerca di alternative naturali, portando alla luce una selezione di fitobiotici e altri prodotti di origine vegetale (Aziz-Aliabad et al., 2026; Flores et al., 2026).

In molti paesi si registra oggi una crescente pressione, da parte dell'opinione pubblica e delle autorità legislative, perché i farmaci anticoccidici tradizionali vengano sostituiti con alternative nuove e socialmente più accettabili. Tra le opportunità emerge un maggiore ricorso a trattamenti "naturali", tra cui sostanze fitochimiche, estratti vegetali, formulazioni a base di erbe e oli essenziali, o probiotici, impiegati come opzioni profilattiche o terapeutiche per il controllo della coccidiosi nel pollame. In alcuni contesti, in particolare nei paesi in via di sviluppo, queste alternative sono già ampiamente utilizzate per il trattamento degli animali, spesso per ragioni di costo o per consuetudini culturali (Tchodo et al., 2024).

Questi prodotti appartengono generalmente a due grandi categorie: gli estratti vegetali e gli oli essenziali. Il termine "estratto vegetale" è un termine generico, utilizzato per descrivere il prodotto ottenuto da un'operazione di separazione solido/liquido, in cui il materiale solido (la pianta) viene immerso in un solvente che ne solubilizza i principi attivi; il prodotto così ottenuto può essere eventualmente sottoposto a una seconda fase di separazione per ricavare un estratto più concentrato (Abubakar e Haque, 2020). Gli estratti vegetali sono relativamente semplici da manipolare e vengono comunemente inclusi nelle diete del pollame per migliorarne lo stato di salute (Akyildiz e Muzaffer, 2016).

Gli oli essenziali (OE) vengono invece ricavati da diverse specie di piante aromatiche mediante un'ampia gamma di metodi di estrazione (Aziz et al., 2018). Possono contenere oltre 200 composti e trovano impiego in diversi settori quali alimentare, farmaceutico, cosmetico e mangimistico, dove sono stati oggetto di numerosi studi volti a valutarne l'efficacia come agenti antimicrobici, antinfiammatori e antivirali. Diverse specie vegetali sono infatti riconosciute per il contenuto di principi attivi, sotto forma di estratti o di oli essenziali, in grado di esercitare attività farmacologiche e antiparassitarie.

Diversi studi hanno valutato gli effetti di miscele di oli essenziali ed estratti vegetali, tra cui combinazioni di carvacolo, cinnamaldeide e oleoresina di *Capsicum* spp, su performance produttive, risposta immunitaria e parametri di coccidiosi nel pollo da carne, generalmente in condizioni sperimentali controllate o in seguito a infezione artificiale (*challenge*). Risultano invece più limitati i dati relativi all'impiego specifico della combinazione di cannella, peperoncino e zenzero, in particolare per quanto riguarda la sua valutazione in condizioni di campo, in allevamento commerciale soggetto a infezione naturale piuttosto che a infezione sperimentale indotta. Il presente lavoro intende quindi contribuire a colmare questa lacuna, fornendo dati di efficacia raccolti in un contesto produttivo reale.

Il presente studio aveva l'obiettivo di valutare l'efficacia, nella profilassi della coccidiosi nel pollo da carne (broiler), di un prodotto fitogenico classificato come mangime complementare e costituito da una combinazione sinergica di oli essenziali ed estratti ottenuti dalla corteccia di cannella (*Cinnamomum cassia*), dal frutto di peperoncino (*Capsicum frutescens*) e dalla radice di zenzero (*Zingiber officinale*), confrontandola con quella di un protocollo di profilassi standard basato sull'alternanza di un anticoccidico chimico e di un ionoforo.

MATERIALI E METODI

Allevamento

La sperimentazione è stata condotta presso un allevamento di polli da carne convenzionale, con inizio il 1° ottobre 2025 e una durata complessiva di 50 giorni.

L'allevamento era comprensivo di 6 capannoni di dimensioni simili, di cui 4, contigui, utilizzati per la prova (capannoni numero 1, 2, 5 e 6). Nei capannoni 1 e 5, utilizzati per il trattamento con il prodotto fitogenico, sono stati accasati 24.650 broiler Ross 308 a sessi misti; nei capannoni 2 e 6, utilizzati come controllo con anticoccidico, sono stati accasati 24.600 soggetti a sessi misti. L'assegnazione dei capannoni ai due trattamenti non è stata randomizzata, ma effettuata secondo uno schema a blocchi basato sulla disposizione strutturale dell'allevamento: i capannoni sono organizzati in coppie strutturalmente omogenee (1-2 e 5-6) e, all'interno di ciascuna coppia, un capannone è stato assegnato al trattamento fitogenico e l'altro al controllo, in modo da bilanciare eventuali differenze strutturali tra le coppie. Il capannone costituisce l'unità sperimentale indipendente ($n = 2$ capannoni/gruppo). La densità di allevamento non ha mai superato i 33 kg/m², rispettando la Direttiva 2007/43/CE del Consiglio del 28 giugno 2007. I capannoni erano dotati di ventilazione forzata e di riscaldamento con cappe a gas per mantenere una temperatura idonea al benessere degli animali. A 31 giorni è stato effettuato un carico parziale (sfoltimento): i soggetti destinati al macello sono stati selezionati esclusivamente in base al sesso, inviando le femmine, secondo la prassi commerciale dell'allevamento.

Durante il ciclo di allevamento, a campione, venivano pesati un centinaio di soggetti, suddivisi in tre pesate per capannone, per valutare la curva di crescita e il consumo di mangime; entrambi i dati venivano calcolati al giorno 7, al giorno 21 e al giorno 31 (sfoltimento con invio delle femmine al macello). Il ciclo si è concluso al giorno 50 con la macellazione finale.

Trattamento

Tutti i gruppi sono stati alimentati con mangimi standard che rispondevano alle linee guida dell'ibrido allevato. La formulazione di base del mangime era identica per tutti i gruppi; le diete differivano unicamente per la natura dell'additivo anticoccidico/fitogenico somministrato. Nei gruppi di controllo la profilassi anticoccidica nell'alimento è stata effettuata secondo le normali prassi dell'allevamento: da 1 a 10 giorni nicarbazina (125 ppm); da 11 a 24 giorni un'associazione paritaria di nicarbazina e narasin (100 ppm); da 25 a 35 giorni salinomycin (60 ppm); nel mangime da finissaggio non era presente alcun anticoccidico.

Nei gruppi trattati è stato invece utilizzato un prodotto fitogenico costituito da una combinazione sinergica di oli essenziali ed estratti ottenuti dalla corteccia di cannella (*Cinnamomum cassia*), dal frutto di peperoncino (*Capsicum frutescens*) e dalla radice di zenzero (*Zingiber officinale*), somministrato al dosaggio di 1,5 kg/tonnellata di mangime per l'intero ciclo di allevamento, fino alla macellazione. Il prodotto è composto al 20% da sostanze naturali botanicamente definite, mentre le proporzioni dei singoli componenti sono coperte da segreto industriale.

Campionamento e analisi di laboratorio

Settimanalmente, due operatori procedevano alla raccolta di feci fresche da più punti di ciascuno dei 4 capannoni, costituendo per ciascun capannone un pool di almeno 80-100 campioni fecali, con un rapporto di circa 1/8-1/10 tra feci ciecali e feci normali. I campioni, mantenuti refrigerati, venivano trasportati presso il laboratorio del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali dell'Università degli Studi di Milano e analizzati entro 24 ore mediante la tecnica McMaster (Long et al., 1976; Haug et al., 2006; Hauck e Pacheco, 2021).

A 21, 28, 35 e 42 giorni di età venivano raccolti i soggetti deceduti, trasportati presso la sala necroscopica del medesimo Dipartimento e sottoposti a valutazione del tratto intestinale, sia integro che dopo sezionamento, al fine di rilevare le eventuali lesioni presenti nei diversi tratti secondo il metodo del *lesion score* (Johnson e Reid, 1970). All'apertura dei tratti intestinali, la mucosa veniva raschiata con un vetrino copri-oggetto, strisciata su un vetrino porta-oggetto e osservata al microscopio ottico (Gazoni et al., 2025).

Analisi statistica

Le differenze tra gruppi sono state valutate mediante modelli lineari considerando il capannone come unità sperimentale. Il confronto è stato condotto separatamente per ciascuna delle 4 età, sulla base di 3 pesate per capannone per età (6 osservazioni per gruppo per confronto); poiché le pesate effettuate nello stesso capannone non costituiscono osservazioni indipendenti, l'unità sperimentale effettiva resta il capannone ($n = 2/\text{gruppo per confronto}$), con la conseguente limitazione di potenza statistica già segnalata. Le analisi sono state condotte con SPSS (versione 30.0) e la significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$. I conteggi di oocisti per grammo di feci (OPG), risultati non normalmente distribuiti anche dopo trasformazione logaritmica (Shapiro-Wilk, $p < 0,001$), sono stati confrontati tra i gruppi mediante test U di Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947).

RISULTATI

I risultati delle conte delle oocisti, espressi come mediana dei 2 capannoni per gruppo, effettuati settimanalmente, sono riportati nella Figura 1 e nella Tabella I. Da qui si evidenzia come l'eliminazione delle oocisti sia andata aumentando nel gruppo trattato, raggiungendo il picco a 28 giorni, mentre nel gruppo controllo è cresciuta più lentamente, raggiungendo il picco la settimana seguente (35 giorni di vita). Entrambi i gruppi hanno mostrato un forte decremento nelle settimane successive al picco. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi (Mann-Whitney $U=125$, $p=0,222$).

Figura 1. Andamento dell'escrezione di OPG per età (valori mediani)

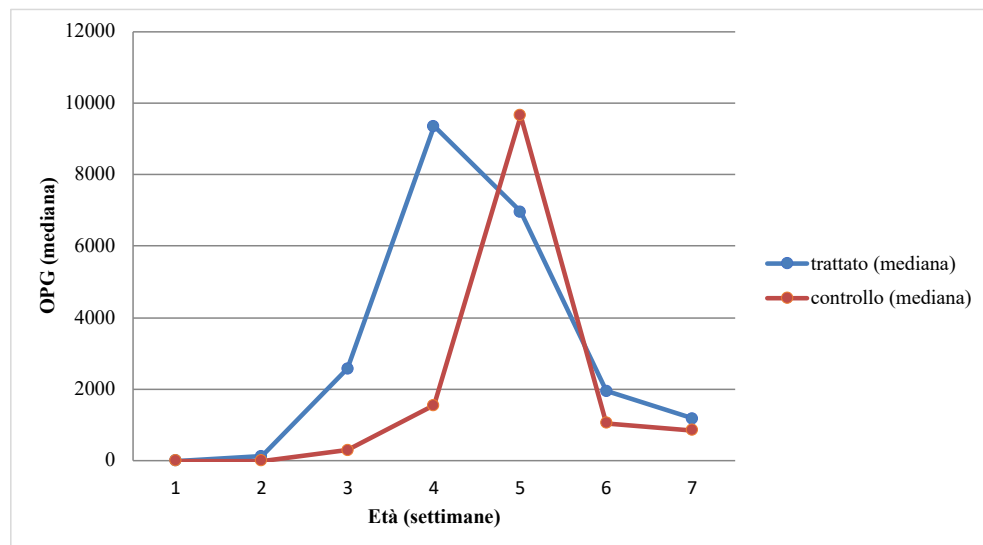


Tabella 1. statistica descrittiva delle emissioni di oocisti per gruppo (dati aggregati per capannone × età, n=14 per gruppo: 2 capannoni × 7 età).

Indicatore	Trattato	Controllo
Media dei 7 controlli settimanali	3.200,0	1.928,6
Mediana	1.750,0	887,5
1° e 3° quartile (Q1-Q3)	287,5 – 3.412,5	81,3 – 1.437,5
Dev. standard	4.340,2-	4.567,5
Minimo	0,0	0,0
Massimo	14.250,0	17.650,0

La valutazione del *lesion score* è stata condotta su 64 soggetti (8 per gruppo per età) nei 4 momenti di controllo previsti (21, 28, 35 e 42 giorni di età).

L'ispezione macroscopica della parete intestinale, condotta prima dell'apertura del lume, non ha evidenziato alterazioni visibili nei tratti del duodeno, del digiuno e dell'ileo in nessuno dei soggetti esaminati e in nessun momento di controllo.

Unicamente a 35 giorni di età, alla valutazione dei ciechi, sono state riscontrate lesioni attribuibili a *E. tenella*: nel gruppo di controllo 3 soggetti su 8 presentavano un punteggio di 1, mentre nel gruppo trattato 2 soggetti su 8 raggiungevano lo stesso punteggio. La causa di morte è stata accertata in sede necroscopica in tutti i casi, escludendo cause diverse dalla coccidiosi. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi per il *lesion score* di *E. tenella* ($p = 0,654$).

L'esame microscopico degli strisci di mucosa ha evidenziato la presenza di oocisti, sempre in modica quantità, in diversi tratti intestinali e in entrambi i gruppi.

A livello duodenale la positività è stata rilevata a partire dalla 3^a settimana di vita e ha persistito fino alla 6^a settimana in entrambi i gruppi. Il tratto del digiuno è risultato positivo a partire dalla 4^a settimana nel gruppo trattato e dalla 5^a settimana nel gruppo di controllo. A 35 giorni gli strisci del tratto ciecale sono risultati positivi, anche in discreta quantità, in linea con quanto osservato macroscopicamente.

In nessun momento e in nessun gruppo le mucose hanno presentato alterazioni tali da far supporre patologie intestinali di altra origine.

L'andamento del peso corporeo alle varie età è riportato in Figura 2. Sono stati osservati scostamenti tra i gruppi in tutti i momenti di controllo, espressi in grammi e in percentuale nella Tabella II. Il confronto statistico, condotto mediante test t per dati appaiati su 8 coppie turno × capannone (4 età × 2 capannoni/gruppo), non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi ($t = 0,182$; $df = 7$; $p = 0,861$).

Figura 2. Curva di crescita - peso medio per settimana

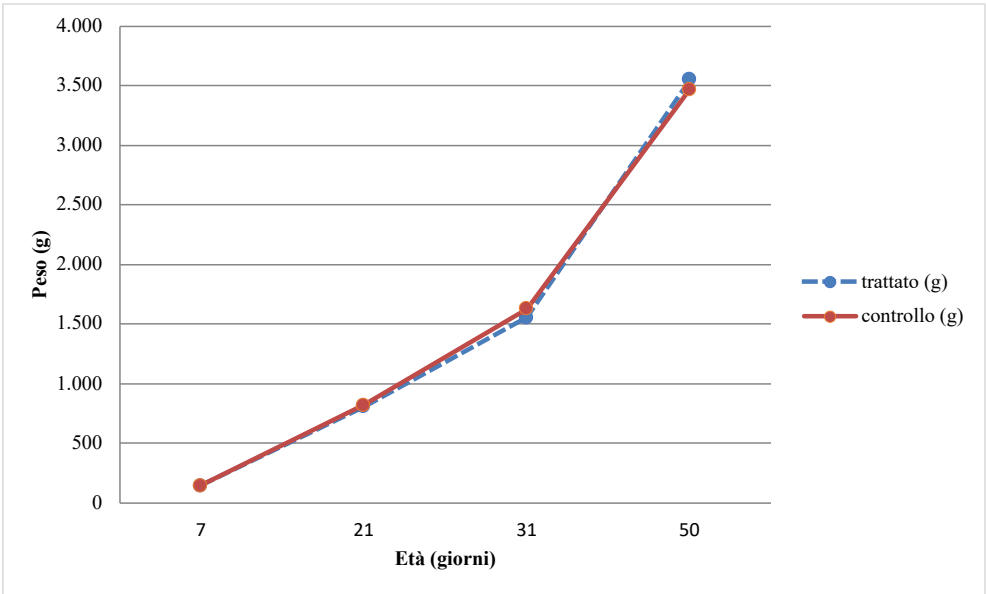
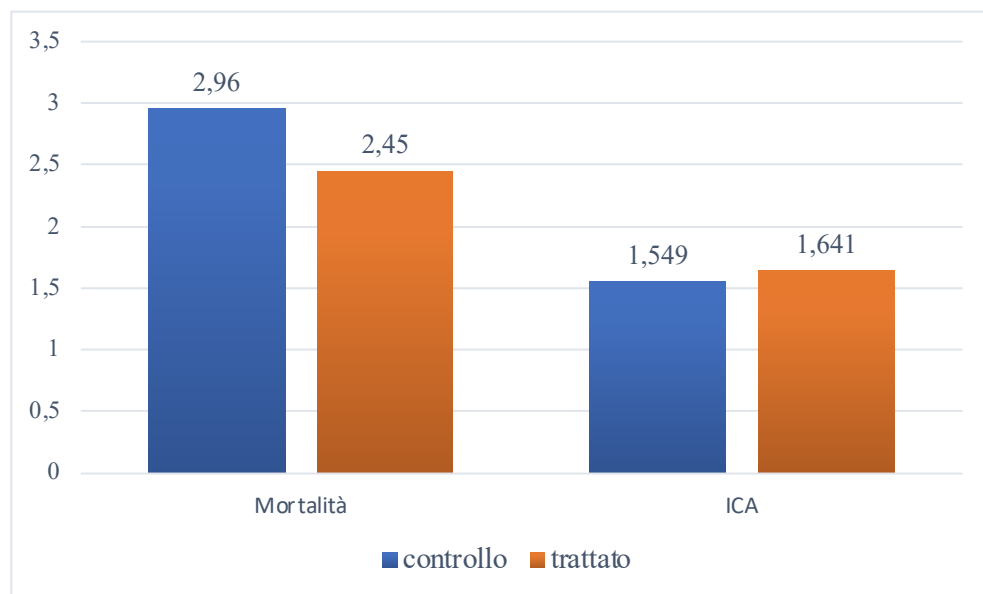


Tabella 2. Statistica descrittiva dei pesi per gruppo e per età.

Età (gg)	Trattato - media (g)	Controllo - media (g)	Differenza (g)	Differenza (%)
7	145,0	145,0	0,0	+0,0%
21	805,8	820,0	-14,2	-1,7%
31	1.555,0	1.626,7	-71,7	-4,4%
50	3.550,0	3.470,0	80,0	+2,3%

I dati di mortalità e di indice di conversione alimentare (ICA) sono disponibili unicamente come valori cumulativi dell'intero ciclo di allevamento, in quanto non è stato possibile raccogliere rilevazioni settimanali. Per questo motivo non è stata condotta un'elaborazione statistica formale per questi parametri. I dati sono riportati in Figura 3.

Figura 3. Mortalità cumulativa in % e Indice di conversione Alimentare (ICA).



DISCUSSIONE

La valutazione della coccidiosi nel pollo si basa tipicamente su *lesion score* e quantificazione delle oocisti, che sono parametri complementari e ampiamente usati; il *lesion score* di Johnson & Reid è il riferimento storico più utilizzato, mentre il conteggio delle oocisti è un indicatore importante dell'escrezione del parassita. Dalle nostre osservazioni risulta che gruppo trattato con il prodotto fitogenico ha raggiunto il picco di eliminazione una settimana prima (28 giorni) rispetto al gruppo di controllo (35 giorni), per poi decrescere rapidamente in entrambi i gruppi nelle settimane successive. Questo andamento è coerente con quanto generalmente descritto in letteratura per i fitobiotici ad attività anticoccidica, il cui meccanismo d'azione non è tanto inibitorio diretto sul ciclo biologico del parassita, quanto piuttosto legato a un'azione di immunomodulazione, di stimolo delle difese antiossidanti e di mantenimento dell'omeostasi della mucosa intestinale, che, nel complesso, si traduce in una più rapida risposta dell'ospite all'infezione (Gadde et al., 2017). Un'anticipazione del picco di escrezione oocistica, seguita da un decremento altrettanto rapido, è descritta anche in altri trial con oli essenziali in broiler sottoposti a *challenge* con *Eimeria* spp. (Gordillo Jaramillo et al., 2021). La scelta di presentare graficamente i dati di conteggio oocistico come mediane deriva dalla cognizione che le conte parassitarie fecali, incluse quelle delle oocisti di *Eimeria*, sono tipicamente overdisperse (distribuzione aggregata, spesso approssimabile a una binomiale negativa) e non seguono distribuzione normale anche dopo trasformazione logaritmica, come osservato anche in altri studi di campo su larga scala in cui la mediana OPG risulta sistematicamente molto inferiore alla media a causa della forte asimmetria distributiva (Snyder et al., 2021). Per questo motivo, la mediana è stata preferita come misura di tendenza centrale, secondo un approccio comunemente adottato in studi statistici su conteggi parassitari fortemente asimmetrici e non normalmente distribuiti (Vickers, 2005). Nel presente lavoro, entrambi i gruppi non hanno mostrato lesioni intestinali rilevanti ai controlli di 21, 28 e 42 giorni. A 35 giorni alcuni soggetti hanno manifestato lesioni di lieve

entità (punteggio 1), verosimilmente riferibili a infezione da *E. tenella* (n = 3/8 nel gruppo di controllo; n = 2/8 nel gruppo trattato). I controlli microscopici della mucosa non hanno mai evidenziato alterazioni indicative di patologia franca, pur confermando la presenza dell'infezione attraverso le conte delle oocisti e le lesioni rilevate a 35 giorni.

Nel complesso, il quadro osservato suggerisce una pressione di campo da *Eimeria* spp. verosimilmente nella norma per un ciclo di allevamento convenzionale. Questa condizione può aver favorito l'espressione dell'efficacia del prodotto fitogenico, analogamente a quanto riportato in altri studi condotti in condizioni di campo. Al contrario, nei modelli sperimentali a *challenge* controllato, le dosi infettanti elevate rendono generalmente più difficile per i fitogenici raggiungere prestazioni equivalenti a quelle dei coccidiostatici di sintesi.

La differenza nel picco di emissione delle oocisti, anticipato nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo, è coerente con quanto riportato da Parent et al. (2018), che hanno osservato picchi anticipati nei gruppi vaccinati rispetto a quelli trattati con anticoccidico chimico o ionoforo. Nel nostro caso, la presenza di nicarbazina nel gruppo di controllo può aver esercitato un controllo più efficace sull'infezione iniziale, posticipandone il picco di emissione.

Il dato più rilevante dal punto di vista applicativo è l'assenza di differenze significative tra i due protocolli, sia per la conta oocistica che per il *lesion score*. Va tuttavia segnalato un limite metodologico: i soggetti esaminati erano deceduti spontaneamente e non soppressi appositamente come previsto dalla metodica classica. Questa scelta, dettata da considerazioni etiche, introduce una minore precisione nel campionamento; la valutazione degli strisci di mucosa dei vari tratti intestinali ha tuttavia contribuito a rendere le osservazioni più affidabili. L'andamento del peso corporeo, pur non mostrando differenze statisticamente significative, ha presentato un andamento altalenante tra i gruppi: a 21 e 31 giorni di vita il gruppo di controllo ha fatto registrare pesi superiori, mentre a 50 giorni il gruppo trattato ha mostrato una performance finale superiore del 2,3% rispetto al controllo.

I dati bibliografici disponibili forniscono indicazioni contrastanti. Va premesso che non esistono lavori specifici su prodotti direttamente sovrapponibili a quello utilizzato nel presente studio; la letteratura disponibile considera frequentemente uno o due dei componenti presenti nel prodotto testato. Scheurer et al. (2013), in condizioni sperimentali con *challenge* da *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella*, hanno riportato performance produttive superiori nei broiler alimentati con anticoccidico ionoforo rispetto a quelli trattati con prodotti fitogenici. Al contrario, Hailat et al. (2024), confrontando le performance produttive e il *lesion score* in gruppi di broiler alimentati con diversi protocolli (nicarbazina + narasin seguiti da narasin, nicarbazina e narasin seguiti da un prodotto fitogenico, e gruppi trattati esclusivamente con fitogenici, tra cui uno a base di flavonoidi, triterpenoidi, alcaloidi steroidei, tannini, acidi fenolici e saponine) non hanno evidenziato differenze significative nelle performance produttive.

Anche Park et al. (2023) hanno dimostrato l'efficacia *in vitro* e *in vivo* di composti a base estratto di tè verde, olio di cannella ed estratto di melograno.

I componenti principali del prodotto utilizzato nel presente studio esercitano effetti che vanno oltre il solo controllo della coccidiosi. Per quanto riguarda l'attività anticoccidica specifica, è stato dimostrato recentemente che l'aldeide cinnamica, derivata dalla cannella, riduce la capacità di sporulazione delle oocisti a concentrazioni elevate (5-10%), sebbene in condizioni sperimentali *in vitro* (Zoroaster et al., 2025). Analogamente, Al-Syaad et al. (2023) hanno evidenziato una significativa attività anticoccidica dell'olio essenziale di *C. verum*, specie affine a *C. cassia*: sia *in vitro* che *in vivo*, questo olio ha dimostrato un notevole effetto oocistocida, accompagnato da un miglioramento dell'indice di conversione alimentare (FCR), della conta oocistica (OPG), del punteggio fecale e dei parametri biochimici sierici.

Sul versante della salute intestinale, i medesimi componenti hanno mostrato effetti benefici sull'apparato gastroenterico, con miglioramenti documentati della funzionalità e dell'integrità intestinale (Zheng et al., 2023).

Allo stesso modo, l'impiego di zenzero (*Zingiber officinale*), sia da solo che in associazione con aglio (*Allium sativum*), si è dimostrato in grado di contenere l'escrescenza di oocisti e di migliorare la *lesion score* in broiler con coccidiosi sperimentale, con risultati comparabili o talvolta superiori a quelli ottenuti con amprolium (Ali et al., 2019). Saber et al (2025) hanno messo in evidenza come l'uso di estratti di zenzero (*Zingiber officinale*) prima e durante l'infezione da coccidi, ha mitigato lo sviluppo cellulare delle oocisti grazie alle sue proprietà immunostimolanti e antiossidanti, come dimostrato dal miglioramento del danno istopatologico al cieco.

Per quanto riguarda il peperoncino, l'attività della capsaicina e degli altri capsaicinoidi presenti nel frutto di *Capsicum annuum* è stata associata sia a un'azione antiossidante e di stimolo dell'appetito, sia a un effetto chemiopreventivo nei confronti della coccidiosi aviaria (Puvača et al., 2015), in linea con quanto osservato nel nostro studio. Anche Lozada-Ortiz et al (2022) hanno dimostrato l'efficacia anticoccidica dei componenti dell'estratto di peperoncino nella profilassi anticoccidica. Herrero et al (2023) hanno dimostrato che l'inclusione nella dieta di 250 ppm di un prodotto incapsulato a base di estratti di peperoncino e altre spezie (pepe nero e zenzero) influisce positivamente sulle prestazioni di crescita nei polli da carne durante la prima settimana di vita. Gli effetti positivi sull'aumento di peso potrebbero essere attribuibili, almeno in parte, a un miglioramento della digeribilità dei nutrienti, e probabilmente a un potenziamento dell'attività dell'amilasi. Inoltre, i risultati suggeriscono che l'integrazione con questi prodotti fitogenici potrebbe potenziare il sistema di difesa dallo stress ossidativo dei polli da carne.

Risultati di efficacia comparabile tra fitogenici e anticoccidici di sintesi o ionofori sono stati riportati anche da altri autori in condizioni sperimentali analoghe: Gordillo Jaramillo et al. (2021), confrontando una miscela di oli essenziali di origano e *Citrus* spp. con salinomycin in broiler sottoposti a *challenge* vaccinale, non hanno osservato differenze significative nelle lesioni duodenali tra i due trattamenti, sebbene la performance ponderale fosse leggermente inferiore nel gruppo trattato con oli essenziali.

Un limite del presente studio, che impone cautela nell'interpretazione e nella generalizzazione dei risultati, è rappresentato però dal numero ridotto di unità sperimentali: la prova ha infatti previsto solo due capannoni per trattamento. Questo disegno, per quanto realistico e rappresentativo delle reali condizioni di allevamento commerciale, comporta una limitata potenza statistica e un rischio di pseudoreplicazione, poiché il capannone, e non il singolo animale, costituisce di fatto l'unità sperimentale indipendente. Le conclusioni qui presentate vanno pertanto considerate come indicative di una tendenza, da confermare attraverso prove con un numero maggiore di replicati e, idealmente, condotte in più cicli produttivi e in diverse stagioni, per tenere conto della variabilità della pressione parassitaria di campo.

Infine, va segnalato che l'impossibilità di disaggregare la mortalità e l'indice di conversione alimentare su base settimanale (Figura 3), dovuta alle modalità di raccolta dati adottate in allevamento, non ha permesso un confronto statistico tra i gruppi per questi due parametri cumulativi, che pure rappresentano indicatori economicamente rilevanti dell'impatto della coccidiosi.

Al di là dei limiti statistici, i risultati ottenuti assumono un significato applicativo rilevante se inquadrati nel contesto delle attuali tendenze del settore avicolo. La sostanziale equivalenza di efficacia tra il prodotto fitogenico e il protocollo anticoccidico convenzionale, unita al fatto che i fitobiotici non necessitano di tempi di sospensione prima della macellazione, rappresenta un vantaggio pratico non trascurabile per l'allevatore, che può gestire con

maggiore flessibilità i piani di carico e l'invio al macello, riducendo il rischio di residui nei tessuti. Questo aspetto si inserisce in un quadro di crescente attenzione, da parte dei consumatori e della filiera, verso prodotti avicoli ottenuti con un minor impiego di sostanze di sintesi. Adhikari et al. (2020) sottolineano come la richiesta dei consumatori di polli allevati senza antibiotici, unita a restrizioni normative e a opportunità commerciali, abbia già spinto molti operatori della filiera avicola ad abbandonare l'uso di promotori di crescita antibiotici, ove ancora permessi, e anticoccidici ionofori o di sintesi chimica, con la conseguenza, però, di un aumento dell'incidenza di coccidiosi ed enterite necrotica che rende necessaria l'individuazione di strategie alternative efficaci. In questo senso, indagini sulla percezione dei consumatori indicano una quota crescente di acquirenti, soprattutto nei paesi a economia avanzata, disposta a preferire carne avicola “*antibiotic-free*” o etichettata come ottenuta con metodi naturali. I fitogenici, non essendo soggetti alle stesse restrizioni regolatorie e alle stesse preoccupazioni relative all'insorgenza di resistenze che riguardano ionofori e anticoccidici chimici, si configurano quindi come un'opzione coerente sia con le esigenze di sostenibilità della filiera sia con le aspettative del mercato, a parità di efficacia zootecnica e sanitaria.

Studi futuri dovrebbero prevedere una raccolta dati strutturata anche per questi parametri, per consentire un'analisi più completa del rapporto costo-beneficio dell'impiego del prodotto fitogenico in condizioni di campo.

Un altro approfondimento andrebbe condotto sull'utilizzo di questi prodotti inseriti in un programma staffetta con gli anticoccidici classici, come adottato da Hailat et al. (2024), soprattutto se utilizzati nel secondo periodo e nel finissaggio.

CONCLUSIONI

Nel presente studio di campo, il prodotto fitogenico a base di aldeide cinnamica, capsaicina e zenzero non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto al programma anticoccidico convenzionale, senza differenze statisticamente significative per nessuno dei tre parametri considerati (conta oocistica, *lesion score* e peso corporeo a fine ciclo). Il picco di escrezione oocistica anticipato nel gruppo trattato, in assenza di un peggioramento delle lesioni intestinali, è coerente con un meccanismo d'azione basato su immunomodulazione e supporto della mucosa intestinale piuttosto che su un'attività parassitocida diretta, in linea con quanto riportato per altri fitobiotici in condizioni di campo.

Dal punto di vista applicativo, l'assenza di tempi di sospensione rappresenta un vantaggio pratico rilevante per l'allevatore, in particolare nel contesto della crescente domanda di pollame allevato con un minor impiego di sostanze di sintesi. Questi risultati, pur indicativi di una tendenza alla non-inferiorità piuttosto che di un'equivalenza dimostrata, supportano l'impiego del prodotto fitogenico come possibile alternativa o componente di programmi a staffetta con gli anticoccidici convenzionali, da confermare con ulteriori studi di campo su scala più ampia.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas Z, Khan SM, Alam J, Khan SW and AM Abbasi. (2017). Medicinal plants used by inhabitants of the Shigar Valley Baltistan region of Karakorum range-Pakistan. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13.
2. Abubakar A and M Haque. (2020). Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12: 1-10.
3. Adhikari P, Kiess A, Adhikari R and R Jha. (2020). An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. *Journal of Applied Poultry Research*, 29: 515-534.

4. Ahmad R, Yu YH, Hua KF, Chen WJ, Zaborski D, Dybus A, Hsiao FS and YH Cheng. (2024). Management and control of coccidiosis in poultry - A review. *Animal Bioscience*, 37: 1-15.
5. Akyildiz S and D Muzaffer. (2016). Application of plant extracts as feed additives in poultry nutrition. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, Vol. LIX.
6. Ali M., Chand N., Khan R.U., Naz S. and S. Gu., (2019). Anticoccidial Effect of Garlic (*Allium sativum*) and Ginger (*Zingiber officinale*) against Experimentally Induced Coccidiosis in Broiler Chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 47: 79-84.
7. Al Syaad KM, Salman M, Abbas RZ, Khan MK and MS Mahmood. (2023). Anticoccidial Effect of *Cinnamomum verum* Essential Oil and Its Impact on Hematological and Serum Biochemical Parameters in Broilers. *Advances in Life Sciences*, 10: 457-463.
8. Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, Rafatullah M, Ganash M, Kamal MA and GM Ashraf. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19: 1100-1110.
9. Aziz-Aliabadi F, Noruzi H and ZK Imari. (2026). A Review of the Control of Coccidiosis in Poultry Using Natural Additives, Focusing on Gut Health and Immunity, *Advances in Agriculture*, 2026: 9936396.
10. Flores RA, Fletcher PLC, Son KY and W Min. (2026). Insights into Non-Antibiotic Alternative and Emerging Control Strategies for Chicken Coccidiosis. *Animals*, 16: 348.
11. Gadde U, Kim WH, Oh S and HS Lillehoj. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal Health Research Reviews*, 18: 26-45.
12. Gazoni FL, Stefanello C, do Santos HF, Boiago M, Galli GM, Téllez-Isaías G and M Juárez-Estrada. (2025). Monitoring Avian Coccidiosis Incidence in Broiler Farms in Brazil: Integrating Eimeria sp. Lesion Scoring with Direct Micro-Quantification of E. maxima Oocysts. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 27.
13. Gordillo Jaramillo FX, Kim DH, Lee SH, Kwon SK, Jha R and KW Lee. (2021). Role of oregano and Citrus species-based essential oil preparation for the control of coccidiosis in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12: 47.
14. Hailat AM, Abdelqader AM and MH Gharaibeh. (2024). Efficacy of phyto-genic products to control field coccidiosis in broiler chickens. *International Journal of Veterinary Science*, 13: 266-272.
15. Hauck R and WJ Pacheco. (2021). Detection of coccidia oocysts in litter and feces of broilers in a floor pen trial. *Journal of Parasitology*, 107: 878-881.
16. Hauck R, Eckert J and C Hunter. (2022). Meta-Analysis of the Use of Eimeria Lesion Scores and Oocyst Counts in Floor-Pen Studies. *Avian Diseases*, 66: 381-388.
17. Haug A, Williams RB and S Larsen. (2006). Counting coccidial oocysts in chicken faeces: a comparative study of a standard McMaster technique and a new rapid method. *Veterinary Parasitology*, 136: 233-42.
18. Haug A, Gjevre A, Thebo, P, Mattsson J.G. and M Kaldhusdal. (2008). Coccidial infections in commercial broilers; epidemiological aspects and comparison of Eimeria species identification by morpho-metric and PCR techniques. *Avian Pathology*, 37: 161-170.
19. Herrero-Encinas J, Huerta A, Blanch M, Pastor JJ, Morais S and D Menoyo. (2023). Impact of Dietary Supplementation of Spice Extracts on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Antioxidant Response in Broiler Chickens. *Animals*, 13: 250.
20. Johnson J and WM Reid. (1970). Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, 28: 30-36.

21. Long PL, Millard BJ, Joyner LP and CC Norton. (1976). A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Veterinaria Latina*, 6: 201-17.
22. Lozada-Ortiz J P, Núñez-Torres O P and J R Guerrero-López. (2022). Assessment of Chili Pepper (*Capsicum annuum*) as an Additive for the Prevention of Coccidiosis. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 17: 97-100.
23. Majid A, Naila C, Rifat UK, Shabana N and G Sina. (2019). Anticoccidial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against experimentally induced coccidiosis in broiler chickens, *Journal of Applied Animal Research*, 47: 79-84.
24. Martins RR, Silva LJG, Pereira AMPT, Esteves A, Duarte SC and A Pena. (2022). Coccidiostats and Poultry: A Comprehensive Review and Current Legislation. *Foods*, 11: 2738.
25. Parent E, Fernandez D and M Boulianne. (2018). The use of a live non-attenuated coccidiosis vaccine modifies *Eimeria* spp. excretion in commercial antibiotic-free broiler chicken flocks compared to conventional shuttle anticoccidial programs. *Poultry Science*, 97: 2740-2744.
26. Park I, Nam H, Wickramasuriya SS, Lee Y, Wall EH, Ravichandran S and HS Lillehoj. (2023). Host-mediated beneficial effects of phytochemicals for prevention of avian coccidiosis. *Frontiers in Immunology*, 14: 1145367.
27. Pietruska A, Bortoluzzi C and R Hauck. (2023). A meta-analysis of the effect of *Eimeria* spp. and/or *Clostridium perfringens* infection on the microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 102: 102652.
28. Puvača N, Ljubojević D, Kostadinović LJ, et al. (2015). Spices and herbs in broilers nutrition: hot red pepper (*Capsicum annuum* L.) and its mode of action. *World's Poultry Science Journal*, 71: 683-688.
29. Saber A, Mawas AS, Khalil AM, Ahmed AI, Shibab Elhamd DMW, Ali E, Rehan IF, Elnagar A, Zigo F and M Salah. (2025). Therapeutic impact of dietary ginger supplementation in chickens experimentally infected with coccidia—anti-oxidant, biochemical, and pathological evaluations. *Frontiers in Veterinary Science*, 12: 1511759.
30. Scheurer W, Spring P and L Maertens. (2013). Effect of 3 dietary phytogetic products on production performance and coccidiosis in challenged broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 22: 591–599.
31. Snyder RP, Guerin MT, Hargis BM, Page G and JR Barta. (2021). Monitoring coccidia in commercial broiler chicken flocks in Ontario: comparing oocyst cycling patterns in flocks using anticoccidial medications or live vaccination. *Poultry Science*, 100: 110–118.
32. Taira K, Nagai T, Obi T and K Takase. (2014). Effect of litter moisture on the development of footpad dermatitis in broiler chickens. *Journal of Veterinary Medical Sciences*, 76: 583-6.
33. Tchodo FG, Dakpogan HB, Sanvee S, Adjei-Mensah B, Kpomasse CC, Karou S, Pitala W, Tona K and , B Bakoma. (2024). The Anticoccidial In Vitro Effects and Antioxidant Properties of Several Plants Traditionally Used for Coccidiosis in Togo. *Veterinary Sciences*, 11: 345.
34. Vickers AJ. (2005). Parametric versus non-parametric statistics in the analysis of randomized trials with non-normally distributed data. *BMC Medical Research Methodology*, 5: 35.
35. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai T, Malone JB Jr, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, et al. (1995). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58: 181-213.

36. Zheng C, Xiao G, Yan X, Qiu T, Liu S, Ou J, Cen M, Gong L, Shi J and H Zhang. (2023). Complex of Lauric Acid Monoglyceride and Cinnamaldehyde Ameliorated Subclinical Necrotic Enteritis in Yellow-Feathered Broilers by Regulating Gut Morphology, Barrier, Inflammation and Serum Biochemistry. *Animals*, 13: 516.
37. Zoroaster A, Raffaelli M, Diaferia M, Veronesi F, Marzoni Fecia di Cossato M, Contiero B, Marani R, Frangipane di Regalbono A and S Perrucci. (2025). In vitro and in vivo effectiveness of essential oils against coccidia in Black Livorno chickens. *BMC Veterinary Research*, 21: 465.

VALUTAZIONE DELLA SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA AVIARIA: LE PROSPETTIVE DEI VETERINARI

Martella L.¹, Zago M.², Crovato S.², Catelli E.¹, Lupini C.¹, Capello K.², Simonetto A.², Cattoli G.², Scolamacchia F.², Mulatti P.², De Nardi M.¹

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

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

Summary: Disease surveillance programmes must be regularly evaluated to ensure they remain effective, efficient and fit for purpose. Surveillance performance can be assessed through a range of attributes reflecting different operational and epidemiological dimensions of the system. This study aimed to investigate veterinarians' perspectives on the evaluation of the Italian avian influenza surveillance system, including the perceived importance of key evaluation attributes, veterinarians' perceived effectiveness of the system, and major strengths and weaknesses. Ten surveillance evaluation attributes were selected based on literature review and programme relevance. A structured questionnaire, developed in LimeSurvey, was administered to 104 veterinarians, working in public sectors or poultry production chains, together with supporting information and instructions. Eighty-one veterinarians completed the survey (77.9% response rate). Respondents showed a balanced prioritization across evaluation attributes, suggesting recognition of the multidimensional nature of surveillance performance. The explanations provided for attribute weighting revealed heterogeneous rationales for prioritisation. Overall, the evaluation of the surveillance system's effectiveness was generally positive, indicating broad acceptance of the system among participating veterinarians. Analysis of reported strengths and weaknesses highlighted a range of sometimes contrasting views, alongside practical suggestions for improving system performance. Reported strengths included the surveillance system's design and implementation approaches, particularly its risk-based framework, its capacity for early detection, and the value of collaboration and coordination among stakeholders and institutions. Main weaknesses were related to the organisation of surveillance activities, especially in wild bird surveillance, as well as the need to improve communication, particularly in the context of passive surveillance. Integrating stakeholder perspectives into surveillance evaluation can support the development of operationally relevant and context-appropriate improvements of avian influenza surveillance systems.

INTRODUZIONE

L'influenza aviaria rappresenta una sfida per la salute globale, a causa del suo potenziale zoonotico e delle ingenti perdite economiche che provoca (Graziosi et al., 2026). In questo contesto, i sistemi di sorveglianza nell'ambito della salute animale sono essenziali per rilevare, prevenire e controllare le malattie infettive (World Organization for Animal Health, 2018), garantendo la protezione della salute animale, della salute pubblica e il mantenimento degli scambi commerciali (Hoinville et al., 2013). In particolare, in Italia il piano di sorveglianza nazionale per l'influenza aviaria integra le misure di sorveglianza attiva basata sui rischi ad un sistema di individuazione precoce tramite sorveglianza passiva, come previsto dal Regolamento Delegato (UE) 2020/689 della Commissione. Il territorio nazionale è stato suddiviso in province ad alto, medio e basso livello di rischio sulla base di quattro fattori principali: specie e tipologia produttiva, localizzazione degli allevamenti avicoli, prossimità alle zone

umide e situazione epidemiologica negli ultimi cinque anni (Regione del Veneto, 2026). Al fine di garantire che i sistemi di sorveglianza forniscano informazioni utili ed attendibili, è necessario che siano sottoposti ad una valutazione periodica (Drewe et al., 2012), basata sull'utilizzo di attributi, definiti come caratteristiche misurabili atte a valutare le performance del sistema (Calba et al., 2015; Drewe et al., 2015). Gli attributi utilizzati per la valutazione dei sistemi di sorveglianza, le loro definizioni, il metodo utilizzato per la loro analisi, insieme ai framework sviluppati nell'ambito della salute pubblica e della sanità animale per implementare la valutazione, sono stati oggetto di diverse revisioni della letteratura. Questi lavori forniscono quindi indicazioni molto precise sugli attributi e sulle strategie più comunemente utilizzate per effettuare la valutazione e come tali sono particolarmente indicati per definire la strategia migliore (Calba et al., 2015; Drewe et al., 2015; Graziosi et al., 2026; Martella et al., 2026). Tipicamente, alcuni attributi sono più frequentemente utilizzati (come la sensibilità e la tempestività), mentre altri variano in base agli obiettivi della valutazione ed al contesto epidemiologico (tra cui la comunicazione e i criteri per la definizione del rischio). Questo studio ha l'obiettivo di indagare le prospettive dei veterinari che operano nella sanità pubblica veterinaria e nelle filiere produttive in merito alla valutazione del piano di sorveglianza nazionale per l'influenza aviaria. In particolare, sono state analizzate le loro opinioni sugli attributi da prioritizzare nella valutazione del sistema, la percezione complessiva dell'efficacia e i principali punti di forza e di criticità emersi dall'esperienza lavorativa.

MATERIALI E METODI

Questionario e reclutamento dei partecipanti

Al fine di indagare le opinioni dei veterinari e la loro percezione sui punti di forza e di criticità del sistema di sorveglianza, è stato sviluppato un questionario online sulla piattaforma LimeSurvey, suddiviso in tre sezioni. La prima sezione del questionario si focalizza sui dati demografici dei rispondenti, fra cui l'ambito lavorativo (settore pubblico o settore privato), il numero di anni di esperienza lavorativa nel settore della sanità animale e le province in cui svolgono la loro professione. La seconda sezione è incentrata sulla prioritizzazione degli attributi maggiormente rilevanti per la valutazione del piano di sorveglianza. Gli attributi sono stati selezionati sulla base della frequenza del loro utilizzo in letteratura e del loro grado di allineamento con gli obiettivi del piano di sorveglianza. Nella terza sezione, è stato richiesto ai partecipanti di indicare il loro livello di conoscenza del piano di sorveglianza, secondo la seguente scala: “molto bene”, “abbastanza”, “poco”, “per nulla”; di valutare la sua efficacia utilizzando una scala Likert a 7 punti, da “per nulla” a “molto”; e di indicare se, secondo la loro esperienza, il piano presenti punti di maggiore efficacia oppure punti deboli o criticità. Il questionario è stato sottoposto ad una fase di pilot-testing eseguita da tre veterinari per verificarne la comprensibilità, la funzionalità e per ottenere indicazioni sul tempo di compilazione richiesto. Inoltre, è stato predisposto materiale informativo relativo agli obiettivi dello studio, alla definizione degli attributi, e alla tipologia di analisi (quantitativa o qualitativa) più frequentemente utilizzata in letteratura per la loro valutazione.

Il reclutamento dei partecipanti è avvenuto attraverso un campionamento a valanga, in cui veterinari operanti nel settore della sanità pubblica veterinaria e all'interno delle filiere avicole italiane sono stati invitati a partecipare allo studio e a segnalare ulteriori partecipanti all'interno della propria rete di contatti.

Il questionario online è stato pubblicato il 9 marzo 2026, stabilendo come termine per la sua compilazione il 30 aprile 2026. Per favorire la partecipazione, sono stati inoltre inviati promemoria con cadenza bisettimanale ai destinatari che non avevano ancora completato il questionario.

Assegnazione dei punteggi agli attributi

Nella seconda sezione del questionario, è stato richiesto ai veterinari di distribuire un totale di 100 punti sui 10 attributi selezionati (Collewet e Koster, 2023) (Tabella 1), assegnando punteggi maggiori agli attributi ritenuti più rilevanti per la valutazione delle performance, dell'efficacia e dell'efficienza del piano di sorveglianza. Inoltre, è stato richiesto di specificare le motivazioni che hanno influenzato la distribuzione dei punteggi tra i diversi attributi e di indicare il livello di sicurezza nell'assegnazione delle risposte, secondo la seguente scala: per niente sicuro/a, poco sicuro/a, abbastanza sicuro/a, molto sicuro/a, completamente sicuro/a.

Tabella 1. Attributi proposti nel questionario, con relativa definizione e tipologia di valutazione comunemente utilizzata.

Attributo	Definizione	Tipologia di valutazione
Accettabilità	La disponibilità delle persone e delle organizzazioni a partecipare nel sistema di sorveglianza e il loro grado di coinvolgimento.	Qualitativa
Benefici	I vantaggi diretti e indiretti prodotti dal sistema di sorveglianza (ad es. in termini di salute animale, salute pubblica, produzione animale, economici).	Quantitativa e/o qualitativa
Costo	Il calcolo delle spese associate alle attività del piano di sorveglianza o ulteriori analisi economiche (es. costi-benefici, costo-efficacia).	Quantitativa
Qualità dei dati	La completezza e la validità dei dati registrati nel sistema di sorveglianza e l'utilizzo di metodi di gestione ed analisi dei dati adeguati.	Quantitativa
Comunicazione e disseminazione	Lo scambio di informazioni e feedback tra tutti i livelli del sistema di sorveglianza.	Quantitativa e/o qualitativa
Criteri per la definizione del rischio	Validità e rilevanza dei criteri di rischio selezionati e dell'approccio/metodo utilizzato per la loro identificazione.	Non disponibile
Rappresentatività	La capacità del sistema di descrivere con precisione l'insorgenza di un evento sanitario nel tempo, geograficamente e nella popolazione.	Quantitativa e/o qualitativa
Sensibilità	La capacità del sistema di sorveglianza di rilevare la presenza di casi e/o variazioni nella diffusione di una malattia nella popolazione.	Quantitativa
Semplicità e stabilità	La struttura e la facilità d'uso del sistema (semplicità) e la capacità di fornire dati corretti e restare operativo quando necessario (stabilità).	Qualitativa
Tempestività	L'intervallo di tempo tra le fasi di un sistema di sorveglianza.	Quantitativa

Analisi statistica

Excel e R (versione 4.4.2) sono stati utilizzati rispettivamente per la gestione e pulizia dei dati e per le analisi statistiche. È stata condotta un'analisi statistica descrittiva per valutare il tasso di risposta al questionario, la distribuzione dei veterinari per settore di impiego (pubblico e privato) e gli anni di esperienza professionale nel settore della sanità pubblica veterinaria dichiarati dai partecipanti. Le province di lavoro riportate dai veterinari sono state codificate in una variabile categorica secondo il livello di rischio definito dal piano di sorveglianza e classificate nei livelli alto, medio e basso. I partecipanti che hanno indicato province ricadenti in differenti livelli di rischio sono stati inclusi nella categoria di rischio "misto". Il livello di conoscenza del piano di sorveglianza è stato analizzato mediante la distribuzione delle frequenze e delle percentuali nelle categorie di risposta "molto bene", "abbastanza", "poco", "per nulla".

La distribuzione dei 100 punti tra gli attributi selezionati è stata analizzata sia in relazione alle modalità di allocazione dei punteggi da parte dei veterinari, sia considerando i punteggi complessivamente assegnati ai diversi attributi. Per valutare le modalità di allocazione dei punteggi da parte dei veterinari, è stato calcolato il range interquartile (o scarto interquartile), definito come la differenza tra il terzo e il primo quartile dei punteggi assegnati da ciascun rispondente, al fine di ottenere un indicatore della variabilità delle risposte. È stata inoltre analizzata la percentuale dei diversi livelli di sicurezza espressi riguardo la distribuzione dei punteggi. I punti complessivamente assegnati ai singoli attributi sono stati descritti attraverso media, mediana e valori minimo e massimo. Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per confrontare i punteggi assegnati agli attributi da diversi gruppi di rispondenti, definiti in base al livello di rischio della provincia in cui svolgono la propria professione e all'ambito lavorativo di appartenenza. A seguito di un risultato statisticamente significativo ottenuto con il test di Kruskal-Wallis, sono stati eseguiti confronti post hoc mediante il test di Dunn, applicando la correzione di Holm per confronti multipli.

Analisi tematica

Le risposte alle domande aperte presenti nella seconda e nella terza sezione del questionario, utilizzate per indagare le motivazioni dell'assegnazione dei punteggi agli attributi, i punti di forza e le principali criticità del piano di sorveglianza percepite dai veterinari, sono state analizzate separatamente mediante un'analisi tematica (Braun e Clarke, 2006). L'analisi tematica è stata eseguita attraverso un approccio induttivo, pertanto le risposte sono state codificate senza stabilire uno schema di codici a priori. Successivamente, i codici assegnati alle risposte sono stati organizzati gerarchicamente per formulare dei temi, i quali sono stati espressi sotto forma di frasi descrittive, in grado di sintetizzare il significato centrale dei segmenti di testo codificati. A una stessa risposta potevano essere attribuiti uno o più codici e, di conseguenza, la stessa risposta poteva confluire in più di un tema.

RISULTATI

Tasso di risposta e caratteristiche dei partecipanti

Attraverso il campionamento a valanga, sono stati reclutati e invitati a partecipare al questionario 104 veterinari. Tra questi, 81 hanno completato il questionario, ottenendo un tasso di completamento dei veterinari invitati e/o tracciati del 77.9%.

La maggior parte dei veterinari (66/81; 81,5%) lavorava nel settore pubblico: il 60,5% presso le Aziende Sanitarie Locali (ASL, AUSL, ATS), il 16% presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e il 4.9% a livello regionale. I restanti veterinari (15/81; 18,5%) operavano nella filiera avicola, occupandosi principalmente di broiler (9.8%), galline ovaiole (9.8%) e riproduttori (7.4%); un veterinario lavorava invece con capponi e fagiani.

La maggior parte dei rispondenti (47/81; 58%) aveva più di dieci anni di esperienza nel settore della sanità animale. Il 16% (13/81) aveva tra sei e dieci anni di esperienza, il 23.4% (19/81) tra uno e cinque anni e solo due rispondenti meno di un anno di esperienza.

Il livello di rischio della provincia di lavoro è stato classificato come alto nel 50.6% dei casi (41/81), seguito dal basso (13/81; 16%) e dal medio (4/81; 4.9%). I restanti veterinari lavoravano in province associate a diversi livelli di rischio, che per le analisi sono state riclassificate come “rischio misto”. In particolare, il 12.3% (10/81) operava in aree comprendenti province a rischio alto, medio e basso, l’11.1% (9/81) in aree con rischio alto e basso e il 4.9% (4/81) in aree con rischio medio e basso.

Il 69,1% (56/81) dei veterinari ha dichiarato di conoscere *abbastanza bene* il piano di sorveglianza, il 27% (22/81) di conoscerlo *molto bene*, mentre il 3,7% (3/81) ha indicato una conoscenza scarsa. Nessun rispondente ha dichiarato di non conoscerlo per nulla.

Assegnazione dei punteggi agli attributi

L’indice di variabilità utilizzato per valutare l’eterogeneità nell’allocazione dei punteggi da parte dei veterinari presenta un valore minimo pari a zero e un valore massimo corrispondente a 17.5, con una mediana pari a 5. Il 25% dei rispondenti si colloca su valori pari o inferiori a 2, mentre il 75% dei rispondenti presenta valori pari o inferiori a 8.

È stato inoltre richiesto di indicare il livello di sicurezza nell’assegnazione dei punteggi agli attributi: il 74% (60/81) dei veterinari ha indicato *abbastanza sicuro/a*, il 14.8% (12/81) *molto sicuro/a*, il 8.6% (7/81) *poco sicuro/a* e solo due hanno risposto *completamente sicuro/a*.

Riguardo l’assegnazione dei punteggi ai singoli attributi, le mediane sono pari a 10 punti/attributo nella maggior parte dei casi, ad eccezione di costo (9). Le medie risultano comprese tra 8,49 (comunicazione e disseminazione) e 11,73 (tempestività).

Gli attributi si differenziano principalmente considerando il range dei punti assegnati (Tabella 2). In particolare, tempestività presenta il valore massimo più elevato (45), seguita da accettabilità (40). Benefici, costo, sensibilità, semplicità e stabilità e rappresentatività raggiungono valori massimi pari a 30, mentre qualità dei dati e criteri per la definizione del rischio presentano un valore massimo pari a 25. L’attributo comunicazione e disseminazione presenta l’intervallo più contenuto (1 - 15).

Tabella 2. Distribuzione dei punteggi per ciascun attributo.

Attributo	Valore minimo	1° quartile	Media	Mediana	3° quartile	Valore massimo
Accettabilità	1	5	9.69	10	12	40
Benefici	1	8	10.9	10	15	30
Costo	1	5	8.65	9	10	30
Qualità dei dati	2	8	10.43	10	12	25
Comunicazione e disseminazione	1	5	8.49	10	10	15
Criteri per la definizione del rischio	2	8	10	10	12	25
Rappresentatività	1	6	9.83	10	12	30
Sensibilità	2	10	11.72	10	15	30
Semplicità e stabilità	1	5	8.56	10	10	30
Tempestività	1	10	11.73	10	15	45

Analisi statistica

L'assegnazione dei punti agli attributi non presentava differenze statisticamente significative tra i gruppi. Il test di Kruskal-Wallis ha evidenziato una differenza per l'attributo accettabilità tra i gruppi stratificati per livello di rischio della provincia di lavoro; tuttavia, le analisi post-hoc non hanno confermato la significatività delle differenze osservate.

L'efficacia del piano di sorveglianza, secondo il punto di vista dei veterinari, è stata valutata mediante una scala Likert a 7 punti. La distribuzione delle risposte ha mostrato una mediana pari a 5, con primo quartile pari a 5 e terzo quartile pari a 6.

Analisi tematica: motivazioni che hanno influenzato la distribuzione dei punteggi tra gli attributi

Relativamente alle motivazioni che hanno orientato la distribuzione dei punteggi tra gli attributi, sono stati identificati quattro temi principali che riflettono differenti criteri utilizzati dai partecipanti per definire le priorità nella valutazione dei sistemi di sorveglianza. Sono state escluse dall'analisi 33 risposte poiché prive di una motivazione esplicita, limitate ad attribuire pari rilevanza a tutti gli attributi o basate esclusivamente sul richiamo all'esperienza personale senza ulteriori argomentazioni.

Il primo tema, comprendente 34 risposte, riguarda *la rilevazione tempestiva dei casi di ma-*

lattia come elemento cardine dell'efficienza del sistema e include le motivazioni fornite da coloro che hanno assegnato punteggi elevati o che hanno evidenziato gli attributi sensibilità e tempestività, sottolineando come la rilevazione precoce rappresenti il presupposto per l'attuazione tempestiva delle misure di controllo e per la riduzione dell'impatto sanitario ed economico. Come riportato da un partecipante, *“Un piano di sorveglianza per l'influenza aviaria in un paese non indenne, ha come scopo l'individuazione precoce del virus unita alla tempestiva applicazione di adeguate misure di contenimento e prevenzione [...]”*. Un altro veterinario, invece, ha ritenuto *“[...] che, rispetto ai costi, si debba dare priorità ad attributi che garantiscano la capacità di rilevare precocemente e in modo stabile nel tempo i casi negli allevamenti[...]”*.

Un secondo tema – *l'importanza del valutare l'implementazione del sistema e la sua rappresentatività*, emerso in 43 risposte, comprende motivazioni che fanno riferimento all'importanza degli attributi relativi alla qualità dei dati, ai criteri per la definizione del rischio, alla rappresentatività, nonché alla semplicità e stabilità del sistema. È stato sottolineato come *“sia prioritaria l'acquisizione di dati di elevata qualità senza i quali è inutile il sistema di sorveglianza; caratteristica direttamente correlata ai criteri per la definizione del rischio”* e che *“Più il sistema è semplice, stabile e con risposte tempestive, basato su dati immediati, maggiori saranno i benefici, con costi minori”*. La rappresentatività è stata descritta come *“fondamentale per impostare correttamente il piano”*.

Il valore del coinvolgimento e della comunicazione tra gli attori e gli enti coinvolti nelle attività di sorveglianza rappresenta un ulteriore tema (30 risposte). Le motivazioni associate agli attributi accettabilità e comunicazione e disseminazione evidenziano come il funzionamento del sistema dipenda non solo dalle sue caratteristiche tecniche, ma anche dalla partecipazione attiva di allevatori, veterinari e altri soggetti coinvolti. I partecipanti hanno osservato che *“[...] i sistemi di sorveglianza non hanno funzionato quando chi li doveva attuare (servizi vet e allevatori) non ci hanno creduto o li hanno ritenuti inutilmente onerosi”* e *“L'efficienza del sistema di sorveglianza credo che sia primariamente dipendente dalla disponibilità e livello di partecipazione di tutti gli operatori coinvolti”*. Inoltre, è stato affermato che *“Con una buona comunicazione e condivisione delle informazioni si ottiene una buona disponibilità delle persone e delle organizzazioni”*.

Infine, 24 risposte hanno sottolineato *la necessità di un piano di sorveglianza economicamente sostenibile che possa garantire i maggiori benefici*. I partecipanti hanno dato priorità agli attributi in ambito economico *“in quanto si ritiene che la sostenibilità economica sia alla base di ogni piano di sorveglianza delle malattie animali”*, sottolineando che *“[...] il piano di sorveglianza debba innanzitutto comportare dei benefici, a vantaggio di filiere, Istituti di ricerca, allevatori, ecc. a cascata fino ai cittadini”*.

Analisi tematica: punti deboli o criticità del piano di sorveglianza

Il 46.9% (38/81) dei veterinari ha ritenuto che il piano di sorveglianza nazionale per l'influenza aviaria non presenti criticità, mentre i partecipanti rimanenti hanno evidenziato problematiche che interessano diversi livelli del sistema, dall'organizzazione delle attività di sorveglianza alla tempestività della rilevazione, fino alla gestione dei dati e alla definizione del rischio.

Il tema principale identificato (41 risposte) riguarda le *criticità percepite del sistema di sorveglianza e il loro impatto sulla sua efficienza*. Per quanto riguarda gli **aspetti organizzativi**, è emersa la necessità di *“[...] potenziare il piano, renderlo più capillare, soprattutto nelle zone ad alta densità avicola colpite e ri-colpite da focolai”*. Allo stesso tempo, i veterinari hanno sottolineato la difficoltà di conciliare la tempestività e la rappresentatività dei controlli con la sostenibilità economica del sistema.

Un secondo elemento ricorrente riguarda la **tempestività**, intesa sia come identificazione precoce, per cui è stata segnalata una “*capacità limitata*”, sia come la tempestività delle segnalazioni da parte degli operatori nel contesto della sorveglianza passiva.

Ulteriori criticità riguardano la **qualità e l'uniformità dei dati raccolti**, considerate elementi fondamentali per garantire un'efficace alimentazione dei sistemi di raccolta e analisi delle informazioni. È stata inoltre evidenziata l'opportunità di rivedere i **criteri di valutazione del rischio**, integrando fattori legati alle caratteristiche della filiera produttiva. Infine, diversi partecipanti hanno espresso la percezione che il ruolo epidemiologico degli allevamenti di piccole dimensioni, degli allevamenti rurali e delle aree classificate a basso o medio rischio sia attualmente sottostimato. In particolare, è stata evidenziata la necessità di aumentare il livello di attenzione anche nelle regioni del Sud Italia, considerando i cambiamenti climatici e la crescente permanenza dei volatili migratori, fattori ritenuti in grado di modificare la distribuzione del rischio.

Un ulteriore tema (17 risposte) riguarda *i limiti e le criticità della sorveglianza nell'avifauna selvatica*. I partecipanti hanno evidenziato come la sorveglianza nei selvatici dipenda dalla sensibilità e dall'iniziativa dei singoli operatori coinvolti. Le attività di sorveglianza sono percepite come poco strutturate e non sufficientemente capillari, soprattutto al di fuori delle aree considerate a maggiore rischio. Un partecipante ha infatti osservato che “*al di fuori dei progetti in corso nelle aree più a rischio (Alto Adriatico), [...] [la sorveglianza] è poco sviluppata e strutturata, molto dipendente dalla sensibilità e iniziativa dei singoli operatori coinvolti*”. Le risposte evidenziano anche la necessità di rafforzare sia la sorveglianza passiva sia quella attiva, promuovendo un maggiore coinvolgimento degli stakeholders, quali cacciatori e inanellatori, e migliorando la rappresentatività dei dati raccolti sull'avifauna selvatica. In particolare, è stato sottolineato come l'implementazione della sorveglianza attiva richieda adeguati investimenti economici e una pianificazione strutturata, comprendente l'identificazione, la formazione e il riconoscimento formale dei soggetti coinvolti. Come riportato da un partecipante, “*senza contributi economici e pianificazione strutturata (individuazione, formazione, attribuzione di un ruolo formale a stakeholder dedicati) è impossibile fare sorveglianza attiva nei selvatici*”.

Infine, l'ultimo tema individuato è la *nessità di migliorare la comunicazione e la collaborazione tra gli attori e gli enti coinvolti nella sorveglianza* (11 risposte). I partecipanti hanno evidenziato l'importanza di migliorare il coordinamento tra i diversi enti istituzionali, tra cui Istituti Zooprofilattici, ASL, CRAS e ATC, nonché tra veterinari ufficiali, veterinari aziendali, filiere produttive ed enti non sanitari. È stata inoltre sottolineata l'opportunità di implementare “*l'inclusione di privati, allevatori amatoriali, associazioni venatorie e ornitologiche, etc., nella sorveglianza passiva per integrare ulteriori informazioni di campo (es. utilizzo anche della c.d. “citizen science”)*”. Secondo i partecipanti, le criticità nella comunicazione e nella collaborazione influiscono direttamente sulle performance del sistema, in particolar modo sulla segnalazione dei casi nel contesto della sorveglianza passiva. Un partecipante dichiara: “*Il primo aspetto critico riguarda la sorveglianza passiva, soprattutto nelle aree a medio e basso rischio, poiché senza un'opportuna formazione della cittadinanza/associazioni venatorie potrebbero non essere segnalati animali rinvenuti morti o moribondi*”.

Analisi tematica: aspetti particolarmente efficaci del piano di sorveglianza

Il 12.3% (10/81) dei partecipanti ha dichiarato che, a loro avviso, il piano di sorveglianza non presenta aspetti particolarmente efficaci. Inoltre, cinque persone hanno riconosciuto l'esistenza di elementi di efficacia, senza tuttavia essere in grado di specificarli o fornire ulteriori dettagli. Le restanti risposte sono state ricondotte a due temi principali.

Il tema maggioritario (73 risposte) riguarda il riconoscimento dei *punti di forza del disegno*

e degli approcci della sorveglianza, e la sua efficienza. In generale, il piano viene descritto come ben strutturato, dettagliato e di agevole applicazione. È stata apprezzata, in particolare, la capacità di adattamento ai diversi contesti territoriali attraverso la rimodulazione richiesta alle regioni, al fine di contestualizzare le attività del piano. Anche le attività diagnostiche sono state valutate positivamente per sensibilità, specificità e tempestività nell'esecuzione dei test molecolari.

Per quanto riguarda l'organizzazione complessiva, i partecipanti hanno sottolineato la chiarezza degli obiettivi e la presenza di protocolli standardizzati, insieme all'integrazione dei dati tra livelli locali, regionali e nazionali e alla definizione di tempistiche e periodicità dei controlli. Un ulteriore elemento ritenuto efficace è la sorveglianza passiva, soprattutto per il coinvolgimento delle filiere produttive. Anche la sorveglianza nell'avifauna selvatica è stata indicata quale elemento efficace, in sette risposte.

Un aspetto rilevante riguarda inoltre l'approccio basato sul rischio, considerato uno dei punti di forza del piano grazie all'analisi dei fattori di rischio legati alla tipologia di allevamento, alle specie target, alla suddivisione del territorio in fasce di rischio, e alla definizione di periodi temporali a maggiore rischio. Tra gli ulteriori elementi positivi sono stati citati la capillarità del sistema, la sua rappresentatività, l'applicabilità operativa e la capacità di identificazione precoce. In particolare, un partecipante ha riportato che *"nel corso dell'ultima ondata di influenza aviaria, il piano di sorveglianza mi ha trasmesso una percezione di ottima early-detection e, nella fase più critica che ha coinvolto la zona [in cui lavoro], ha saputo giustamente modularsi per rispondere pienamente alle necessità del territorio in un frangente di elevata pressione"*.

Un secondo tema (12 risposte) riguarda *il valore della collaborazione e del coordinamento tra gli attori coinvolti nel piano*. In questo ambito, i partecipanti hanno evidenziato come punto di forza la buona partecipazione e il coordinamento degli attori pubblici e privati, e degli enti istituzionali. È stata inoltre sottolineata l'accettabilità del piano di sorveglianza da parte degli allevatori, insieme a una comunicazione ritenuta efficace e a un buon livello di coinvolgimento delle filiere.

DISCUSSIONE

Questo studio ha permesso di valutare le percezioni dei veterinari riguardo agli attributi da prioritizzare nella valutazione del piano nazionale di sorveglianza per l'influenza aviaria, nonché la loro opinione in merito ai punti di maggiore efficacia e alle principali criticità del sistema. Per quanto a nostra conoscenza, si tratta del primo studio di questo tipo condotto in Italia. Il tasso di risposta relativamente elevato osservato in questo studio (77.9%) suggerisce un buon livello di coinvolgimento e di attenzione al tema indagato tra i professionisti raggiunti.

La distribuzione dei punteggi tra gli attributi ha evidenziato un'elevata eterogeneità nei pattern di allocazione tra i rispondenti. La maggior parte dei partecipanti presenta livelli di variabilità nell'assegnazione dei punteggi da bassi a moderati, mentre una quota di rispondenti mostra una marcata concentrazione dei punteggi su pochi attributi, riconducibile all'adozione di strategie di valutazione più selettive.

Per quanto riguarda i punteggi assegnati ai singoli attributi, le mediane ottenute risultano complessivamente simili tra loro, ad eccezione del costo, che si discosta parzialmente. Sebbene la valutazione economica dei sistemi di sorveglianza sia riconosciuta da alcuni autori come una componente fondamentale (Drewe et al., 2015), essa non viene frequentemente inclusa nelle valutazioni. In questo contesto, le differenze osservate riflettono approcci eterogenei: alcuni veterinari attribuiscono priorità alla sostenibilità economica, considerandola un elemento fondante di ogni piano di sorveglianza; altri ritengono invece che i costi siano

subordinati a indicatori di performance legati all'identificazione precoce dei casi di malattia, quali tempestività e sensibilità; altri ancora evidenziano come i costi possano essere ottimizzati attraverso il miglioramento di attributi organizzativi come semplicità e stabilità.

Nonostante la similarità delle mediane non suggerisca una marcata divergenza nell'importanza attribuita ai diversi attributi, l'analisi dei range evidenzia una maggiore variabilità nei valori estremi. In particolare, la tempestività presenta il massimo più elevato (45), coerentemente con gli obiettivi di identificazione precoce del piano. Tale risultato è supportato dalle motivazioni fornite dai partecipanti, che hanno sottolineato l'importanza dell'individuazione precoce del virus e della tempestiva implementazione di misure di contenimento e prevenzione. Anche l'accettabilità raggiunge valori massimi elevati (40), riflettendo il ruolo cruciale del coinvolgimento degli stakeholder e degli attori istituzionali nelle attività di sorveglianza. In particolare, nelle motivazioni fornite dai rispondenti, la disponibilità e la fiducia degli attori coinvolti sono considerate fondamentali, soprattutto nel contesto della sorveglianza passiva, poiché una percezione di eccessivo carico economico o una scarsa fiducia nel sistema possono comprometterne l'efficacia operativa. Questo risultato è in linea con quanto affermato da altri autori, secondo i quali l'accettabilità può essere considerata un attributo fondamentale (Auer et al., 2011; Calba et al., 2015). Nonostante l'attributo comunicazione e disseminazione sia stato evidenziato come un elemento che può influire sull'accettabilità del sistema di sorveglianza, esso presenta il valore massimo più basso (15), suggerendo che non sia stato percepito come uno dei driver principali nella prioritizzazione degli attributi.

L'assenza di una marcata differenziazione nella prioritizzazione degli attributi può essere interpretata alla luce dell'indicazione di Drewe e colleghi (2012), secondo cui è opportuno utilizzare tra cinque e dieci attributi per valutare complessivamente un sistema di sorveglianza. La maggior parte degli attributi proposti all'interno dello studio corrispondono a quelli più frequentemente utilizzati in letteratura per valutare i sistemi di sorveglianza nell'ambito della sanità pubblica veterinaria (Martella et al., 2026). Tuttavia, sono stati inseriti alcuni attributi, come comunicazione e disseminazione e criteri per la definizione del rischio (Peyre et al., 2019), utilizzati in modo limitato. Questo suggerisce che questi attributi, nonostante siano scarsamente impiegati in letteratura, siano ritenuti rilevanti ai fini della valutazione del piano nazionale di sorveglianza per l'influenza aviaria.

La valutazione complessiva dell'efficacia del sistema di sorveglianza risulta tendenzialmente positiva, indicando una buona accettazione generale del sistema da parte dei veterinari coinvolti. Tuttavia, l'analisi tematica dei punti critici e dei punti di forza ha evidenziato una serie di aspetti talvolta contrastanti.

Tra i punti critici, emergono la necessità di potenziare il piano e di renderlo maggiormente capillare, nonché le difficoltà nel conciliare tempestività e rappresentatività con la sostenibilità economica. Anche l'identificazione precoce viene talvolta descritta come caratterizzata da "*capacità limitata*", in particolare per quanto riguarda la sorveglianza passiva. Tuttavia, altri partecipanti considerano il piano ben strutturato, dettagliato, di facile applicazione, con obiettivi e protocolli standardizzati e una buona integrazione dei dati tra i diversi livelli, sottolineandone le adeguate capacità di identificazione precoce. Questo potrebbe indicare che alcune criticità non risiedano necessariamente nel disegno del sistema, ma nella sua implementazione operativa e nell'eterogeneità dei contesti territoriali.

Analogamente, i criteri di rischio utilizzati per la pianificazione delle attività di sorveglianza rappresentano un punto di forza riconosciuto, ma sono allo stesso tempo oggetto di criticità. Tali osservazioni derivano dalla richiesta di un loro affinamento per considerare maggiormente le aree a rischio medio-basso, gli allevamenti di piccole dimensioni e rurali e per integrare le modalità di gestione delle filiere produttive all'interno di tali criteri.

La sorveglianza dell'avifauna selvatica rappresenta un ulteriore esempio di questa dualità:

sebbene sia stata indicata tra i punti di forza, ne viene evidenziata una limitata implementazione operativa, in quanto considerata poco strutturata e non sufficientemente capillare al di fuori delle aree a maggior rischio. Inoltre, si ritiene che la sua efficacia sia in parte condizionata dalle risorse disponibili e dall'iniziativa degli operatori coinvolti.

Infine, la variabilità delle opinioni sulla comunicazione e sulla collaborazione tra gli attori suggerisce che il funzionamento del sistema sia influenzato anche dalle dinamiche relazionali e organizzative nei diversi contesti operativi.

Nel loro insieme, questi elementi suggeriscono che il sistema sia concettualmente solido e ben strutturato, con margini di ulteriore consolidamento soprattutto sul piano dell'armonizzazione delle pratiche e del rafforzamento delle sinergie tra i diversi stakeholders.

La principale limitazione di questo studio è rappresentata dal campionamento a valanga adottato, il quale presenta intrinsecamente alcune limitazioni (Kirchherr e Charles, 2018). In particolare, l'assenza di uno schema di campionamento limita la generalizzabilità dei risultati alla popolazione, sebbene alcuni autori sostengano che l'obiettivo della ricerca qualitativa non sia la generalizzazione dei risultati, bensì l'analisi approfondita e la comprensione di uno specifico fenomeno. Inoltre, questo approccio può favorire la partecipazione di soggetti maggiormente interessati al tema, mentre individui meno inclini alla partecipazione o con reti professionali più limitate potrebbero essere sottorappresentati o esclusi. Tuttavia, per migliorare la rappresentatività del campione, è consigliabile iniziare con dei "semi" eterogenei; a tal fine, tra i primi contatti sono stati inclusi sia veterinari del settore pubblico sia veterinari del settore privato. Nonostante ciò, il campione ha incluso prevalentemente veterinari operanti in province classificate ad alto rischio per l'introduzione e la diffusione dell'influenza aviaria. Tale distribuzione potrebbe suggerire che i veterinari operanti in aree a maggiore rischio, essendo più frequentemente coinvolti nella gestione dell'influenza aviaria, siano stati più facilmente identificati e segnalati dai partecipanti iniziali, contribuendo così alla loro sovrarappresentazione nel campione.

CONCLUSIONI

Le percezioni dei veterinari hanno evidenziato una prioritizzazione equilibrata degli attributi per la valutazione del piano di sorveglianza nazionale per l'influenza aviaria. La particolare enfasi attribuita alla tempestività suggerisce che venga assegnato un valore rilevante alla capacità del sistema di rilevare precocemente i casi. L'analisi dei punti di efficacia e delle criticità del sistema ha messo in luce diversi aspetti, talvolta contrastanti, accompagnati da suggerimenti utili al miglioramento dell'efficacia del piano. L'integrazione delle prospettive degli stakeholder nella valutazione della sorveglianza può favorire il miglioramento del piano nazionale di sorveglianza dell'influenza aviaria, rendendo gli interventi più adeguati al contesto e rilevanti sul piano operativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Auer AM, Dobmeier TM, Haglund BJ, Tillgren P. The relevance of WHO injury surveillance guidelines for evaluation: learning from the Aboriginal Community-Centered Injury Surveillance System (ACCIS) and two institution-based systems. *BMC Public Health*. 2011;11:744. doi: 10.1186/1471-2458-11-744.
2. Braun, V., & Clarke, V. (2006). Using thematic analysis in psychology. *Qualitative Research in Psychology*, 3(2), 77–101. <https://doi.org/10.1191/1478088706qp063oa>
3. Calba, C., Goutard, F.L., Hoinville, L., Hendriks, P., Lindberg, A., Saegerman, C., Peyre, M., 2015. Surveillance systems evaluation: a systematic review of the existing approaches. *BMC Public Health* 15, 448. doi: 10.1186/s12889-015-1791-5.
4. Collewet, M., Koster, P., 2023. Preference estimation from point allocation experiments.

- Journal of Choice Modelling 48, Article 100430. doi: [10.1016/j.joem.2023.100430](https://doi.org/10.1016/j.joem.2023.100430)
5. Drewe, J.A., Hoinville, L.J., Cook, A.J.C., Floyd, T., Gunn, G., St`ark, K.D.C., 2015. SERVAL: a new framework for the evaluation of animal health surveillance. *Trans-bound. Emerg. Dis.* 62, 33–45. <https://doi.org/10.1111/tbed.12063>.
 6. Drewe, J.A., Hoinville, L.J., Cook, A.J.C., Floyd, T., St`ark, K.D.C., 2012. Evaluation of animal and public health surveillance systems: a systematic review. *Epidemiol. Infect.* 140, 575–590. <https://doi.org/10.1017/S0950268811002160>.
 7. Graziosi, G., Fornasiero, D., Martella, L., Cattoli, G., Mulatti, P., Catelli, E., De Nardi, M., 2026. Surveillance systems evaluation in the context of avian diseases: a scoping review on current approaches and attributes. *Avian Pathol.* 1–17. <https://doi.org/10.1080/03079457.2025.2565234>.
 8. Hoinville, L.J., Alban, L., Drewe, J.A., Gibbens, J.C., Gustafson, L., H`asler, B., Saegerman, C., Salman, M., St`ark, K.D.C., 2013. Proposed terms and concepts for describing and evaluating animal-health surveillance systems. *Prev. Vet. Med.* 112, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2013.06.006>.
 9. Kirchherr J, Charles K. Enhancing the sample diversity of snowball samples: Recommendations from a research project on anti-dam movements in Southeast Asia. *PLoS One*. 2018 Aug 22;13(8):e0201710. doi: 10.1371/journal.pone.0201710.
 10. Martella L, Scolamacchia F, Mulatti P, Cattoli G, Lupini C, De Nardi M. The evaluation of surveillance systems in veterinary public health: A scoping review on the attributes and assessment frameworks most commonly used. *Prev Vet Med.* 2026 Aug;253:106879. doi: 10.1016/j.prevetmed.2026.106879.
 11. Peyre M, Hoinville L, Njoroge J, Cameron A, Traon D, Goutard F, Calba C, Grosbois V, Delabougliise A, Varant V, Drewe J, Pfeiffer D, Häsler B. The RISKSUR EVA tool (Survtool): A tool for the integrated evaluation of animal health surveillance systems. *Prev Vet Med.* 2019 Dec 1;173:104777. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104777.
 12. Regione del Veneto. Piano nazionale per la sorveglianza dell'influenza aviaria nel pollame e nei volatili selvatici per l'anno 2026. Accessibile presso: https://www.resolveveneto.it/wp-content/uploads/2025/01/57534_2026-Trasm.-Piano-Naz.-I.A.-2026.pdf
 13. World Organisation for Animal Health. (2018). Animal Health Surveillance. *Terrestrial Animal Health Code*. Accessibile presso: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2018/en_chapitre_surveillance_general.htm

EFFICACE INATTIVAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE MEDIANTE ELEVATE PRESSIONI IDROSTATICHE: UN APPROCCIO PROMETTENTE PER APPLICAZIONI VACCINALI

Quaglia G.¹, Catelli E.¹, Rocculi P.², Morbarigazzi M.³, Lupini C.¹

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

² *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari- DISTAL, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Cesena (FC), Italia.*

³ *Honey Data Società Semplice, Parma, Italy.*

Summary

Avian metapneumovirus (aMPV) is a significant viral respiratory pathogen affecting poultry worldwide, posing substantial health and economic challenges to the poultry industry despite the implementation of vaccination programs. Conventional live and inactivated vaccines are commonly used to prevent disease. High hydrostatic pressure (HHP) has emerged as a promising alternative strategy capable of inactivating viral particles while preserving antigenic structures.

This preliminary study aimed to explore the potential of HHP as an inactivation method for the production of aMPV vaccines.

aMPV subtypes A and B were propagated and titrated in Vero cell cultures before being subjected to HHP treatment at increasing pressure levels (300, 400, 500, and 600 MPa). Reduction of viral infectivity was subsequently evaluated by virus titration, and assessment of complete inactivation by RT-qPCR analysis at multiple post-infection time points. Results demonstrated a pressure-dependent reduction in viral titres. High hydrostatic pressure appears to be an effective method for inactivating aMPV at sufficiently high-pressure levels, supporting its potential application in the development of inactivated vaccines. Although these results are promising, further studies are needed to evaluate the impact of HHP treatment on the antigenic properties of the major viral proteins and its ability to elicit a protective immune response.

INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV) è un virus a RNA a singolo filamento a polarità negativa appartenente alla famiglia *Pneumoviridae*, responsabile di patologie respiratorie nel pollame con rilevante impatto sanitario ed economici. L'infezione colpisce principalmente tacchini e polli, causando sintomi respiratori, riduzione delle performance produttive e, nelle galline ovaiole, alterazioni della deposizione (Cook, 2000). Nonostante l'applicazione della vaccinazione, il controllo di aMPV rimane complesso, soprattutto nelle aree ad alta densità avicola. Le strategie vaccinali attualmente disponibili comprendono vaccini vivi attenuati e inattivati (Salles et al., 2023). I vaccini vivi sono efficaci nell'induzione dell'immunità mucosale, ma presentano limiti legati alla possibile diffusione del ceppo vaccinale, al rischio di riacquisizione di virulenza (Catelli et al., 2006; Lupini et al., 2011) e alla limitata cross-protezione tra i diversi sottotipi circolanti. I vaccini inattivati sono utilizzati negli animali a lunga vita produttiva ed ottenuti mediante metodi convenzionali chimici. L'alta pressione idrostatica (High Hydrostatic Pressure, HHP) si è affermata come un'efficace tecnologia di processo non termica, inizialmente sviluppata nell'industria alimentare per l'inattivazione dei microrganismi, garantendo al contempo il mantenimento delle proprietà nutrizionali e organolettiche degli alimenti (Farr, 1990). Più recentemente, questa tecnologia ha suscitato

un crescente interesse anche in ambito biomedico come strategia innovativa per l'inattivazione virale, grazie alla sua capacità di sopprimere l'infettività preservando l'integrità strutturale e antigenica delle proteine virali (Barroso et al., 2021; de Souza et al., 2019). Tali caratteristiche rendono l'HHP una promettente piattaforma per lo sviluppo di vaccini inattivati.

Alla luce di queste considerazioni, il presente lavoro ha avuto l'obiettivo di valutare l'efficacia HHP come metodica di inattivazione di aMPV sottotipi A e B, su colture cellulari, mediante valutazione della riduzione della infettività virale tramite titolazione e verifica della completa inattivazione tramite RT-qPCR a diversi time-point post-infezione.

MATERIALI E METODI

Cellule e ceppi virali

Per la propagazione virale sono state utilizzate colture cellulari VERO, coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementato con 10% siero fetale bovino (FBS), 1% penicillina/streptomicina, 1% L-glutamina, 0,075% bicarbonato di sodio e 1% sodio piruvato, incubate a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂.

Sono stati utilizzati due ceppi di aMPV appartenenti ai sottotipi A (IT/Ty/A/259-01/03) e B (IT/Ty/B/Vr240/87) adattati alla crescita su cellule VERO, nelle cui colture erano in grado di indurre effetto citopatico (CPE) caratterizzato dalla formazione di sincizi cellulari e dal progressivo distacco del monostrato cellulare. Il surnatante è stato raccolto 72 ore dopo l'infezione, chiarificato mediante centrifugazione a $3.500 \times g$ per 20 minuti a 4 °C e suddiviso in aliquote in sacchetti di plastica in polietilene trasparente per uso alimentare, sigillati ermeticamente. L'inattivazione mediata da alta pressione idrostatica è stata effettuata utilizzando un sistema ad alta pressione (Avure Technologies Inc., Erlanger, Kentucky, USA). Stock virali non trattati mediante HHP sono stati tenuti come controllo e processati in parallelo.

Trattamento di inattivazione virale mediante HHP

L'inattivazione mediata da alta pressione idrostatica è stata effettuata utilizzando un sistema ad alta pressione (Avure Technologies Inc., Erlanger, Kentucky, USA), secondo quanto descritto da Brandolini et al. (2025).

I sacchetti sono stati posizionati direttamente all'interno della camera di pressurizzazione; l'aria è stata rimossa dal recipiente mediante una pompa automatica e l'acqua è stata pressurizzata per generare una pressione isostatica, trasmessa attraverso i sacchetti contenenti la sospensione virale. La pressione all'interno della camera è stata aumentata a una velocità di 200 MPa/minuto.

Sono stati testati quattro diversi livelli di pressione: 300, 400, 500 e 600 Mpa. I campioni virali sono stati quindi conservati a -80 °C fino alle successive analisi.

Valutazione della riduzione della infettività virale tramite titolazione virale

L'inattivazione virale a seguito del trattamento mediante HHP è stata valutata mediante titolazione virale degli stock virali trattati su colture cellulari VERO eseguendo diluizioni seriali (dal tal quale TQ a 10^{-11}) e inoculando il monostrato cellulare confluyente di cellule. Dopo adsorbimento per 1,5 ore a 37 °C 5%CO₂, l'inoculo è stato sostituito con terreno di mantenimento contenente 2% FBS e le colture sono state incubate per 72 ore. La presenza di CPE è stata valutata quotidianamente e il titolo virale è stato calcolato secondo il metodo di Reed e Muench (1938), espresso come TCID₅₀/mL.

Valutazione della completa inattivazione virale tramite RT-qPCR

La completa inattivazione è stata verificata coltivando gli stock virali trattati, presumibilmente inattivati, su cellule VERO. La replicazione virale è stata valutata a 12, 24, 36, 48 e 72 ore post-infezione mediante RT-qPCR (Cecchinato et al., 2013).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita mediante GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA). I dati sono stati analizzati con ANOVA a una via seguita da test post-hoc di Tukey per il confronto tra gruppi. La significatività statistica è stata definita per $p < 0,05$.

RISULTATI

Valutazione della riduzione della infettività virale tramite titolazione virale

Dopo il trattamento con HHP, la riduzione dell'infettività virale è stata valutata mediante titolazione. Il trattamento a 300 MPa ha determinato una significativa riduzione dell'infettività, pari rispettivamente a 4 e 3,5 log₁₀ per i sottotipi A e B rispetto ai controlli non sottoposti a HHP. Ai livelli di pressione di 400, 500 e 600 MPa non è stato rilevato alcun virus infettivo, suggerendo una completa inattivazione virale per entrambi i sottotipi.

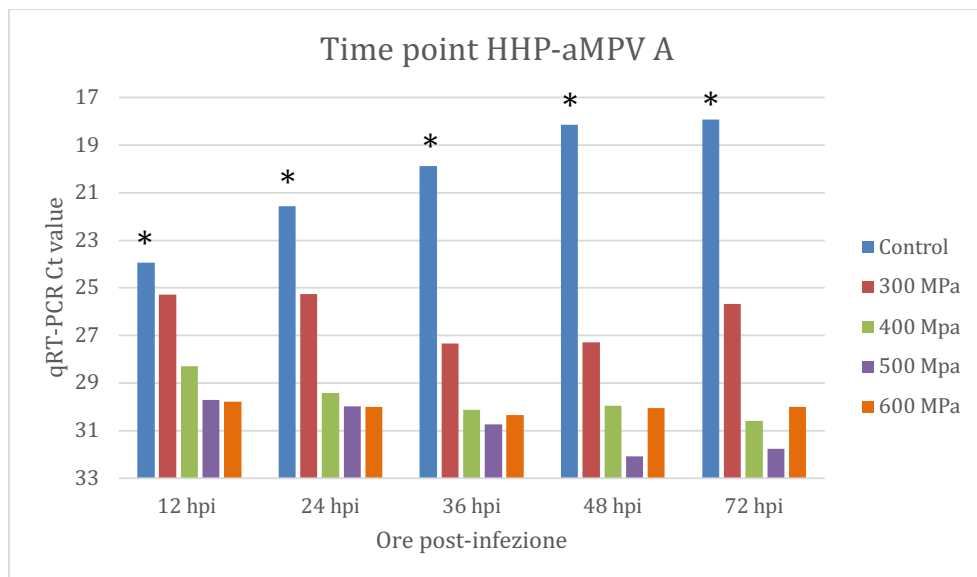
La completa inattivazione è stata ulteriormente verificata coltivando gli stock virali presumibilmente inattivati su cellule VERO e valutando la replicazione virale mediante qRT-PCR. Tutti i trattamenti hanno determinato una soppressione costante della replicazione virale; la carica virale è diminuita tra 0 e 72 ore post-infezione, indicando che le pressioni esercitano un effetto inibitorio più marcato sulla replicazione del virus, fino alla sua completa abolizione (Figura 1).

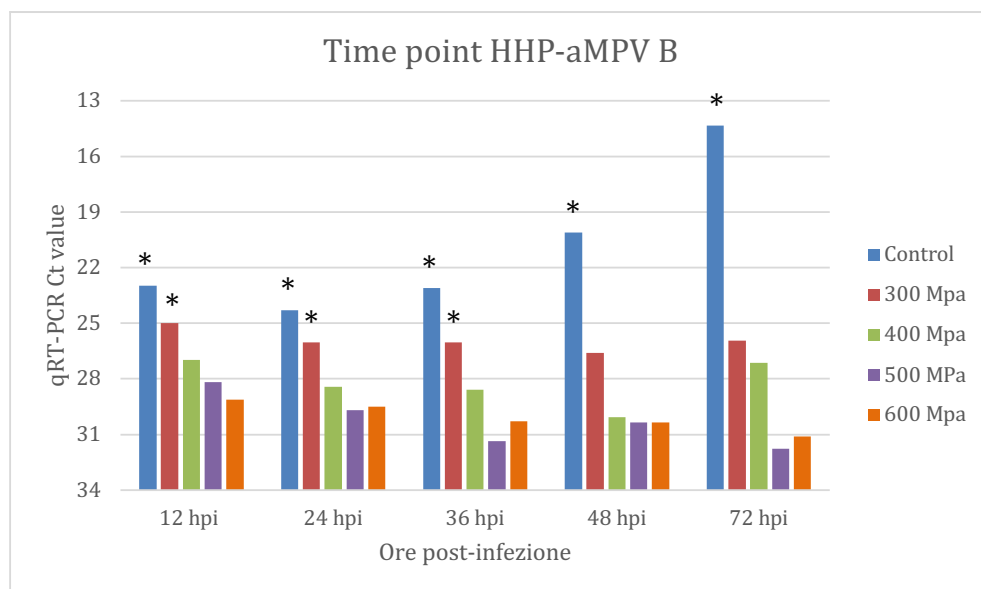
Figura 1.

Rappresentazione grafica dei risultati di RT-qPCR ottenuti da colture cellulari infettate con isolati di aMPV A (in alto) e aMPV B (in basso) sottoposti a trattamento mediante alta pressione idrostatica (HHP) a 300, 400, 500 e 600 MPa, confrontati con il controllo non trattato (Control).

I valori di Ct sono riportati in funzione delle ore post-infezione (0, 12, 24, 36, 48 e 72 h).

Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative rispetto al controllo non trattato allo stesso time point (* $p < 0,05$).





DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano che l'alta pressione idrostatica riduce l'infettività di aMPV in maniera pressione-dipendente, fino a determinarne la completa inattivazione ai livelli di 400, 500 e 600 MPa. Questi dati sono in accordo con studi precedenti che hanno evidenziato il potenziale dell'HHP nell'inattivazione di diversi virus preservandone l'integrità (Barroso et al., 2021). Sebbene i risultati siano promettenti, saranno necessari ulteriori studi per valutare l'effetto del trattamento sulle proprietà antigeniche delle principali proteine virali e sulla capacità di indurre una risposta immunitaria protettiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Barroso, S. P. C., Vicente Dos Santos, A. C., Souza Dos Santos, P., Dos Santos Silva Couceiro, J. N., Fernandes Ferreira, D., Nico, D., Morrot, A., Lima Silva, J., & Cheble de Oliveira, A. (2021). Inactivation of avian influenza viruses by hydrostatic pressure as a potential vaccine development approach. *Access Microbiology*, 3(4), 000220. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000220>
2. de Souza, A. R., et al. (2019) Porcine parvovirus VP1/VP2 on a time series epitope mapping: exploring the effects of high hydrostatic pressure on the immune recognition of antigens. *Virol. J.* 16, 75.
3. Brandolini, M., Rocculi, P., Morbarigazzi, M. et al. (2025). Development and in vivo evaluation of a SARS-CoV-2 inactivated vaccine using high hydrostatic pressure. *npj Vaccines* 10, 83. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01136-7>
4. Catelli, E., Cecchinato, M., Savage, C. E., Jones, R. C., & Naylor, C. J. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine*, 24(42–43), 6476–6482. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.076>
5. Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O. S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M., & Catelli, E. (2013). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous

- identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 42(3), 283–289. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.788130>
6. Cook, J. K. (2000). Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *Veterinary Journal* (London, England: 1997), 160(2), 118–125. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0486>
 7. Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 1, 14–16 (1990).
 8. Lupini, C., Cecchinato, M., Ricchizzi, E., Naylor, C. J., & Catelli, E. (2011). A turkey rhinotracheitis outbreak caused by the environmental spread of a vaccine-derived avian metapneumovirus. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 40(5), 525–530. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.607428>
 9. Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3), 493–497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
 10. Salles, G. B. C., Pilati, G. V. T., Muniz, E. C., de Lima Neto, A. J., Vogt, J. R., Dahmer, M., Savi, B. P., Padilha, D. A., & Fongaro, G. (2023). Trends and Challenges in the Surveillance and Control of Avian Metapneumovirus. *Viruses*, 15(9), 1960. <https://doi.org/10.3390/v15091960>

EFFETTO SULLA REPLICAZIONE DI *SALMONELLA INFANTIS* NEI BROILER DELLE DIVERSE STRATEGIE DI CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI E DELL'IMMUNITÀ PASSIVA MATERNA INDOTTA DALLA VACCINAZIONE DEI RIPRODUTTORI CON VACCINO INATTIVATO CONTRO *SALMONELLA INFANTIS*

Tampieri M.G.¹, Gallina G.², Volorio A.¹, Russo E.¹

¹ MSD Animal Health, Strada di Olgia Vecchia, Centro Direzionale Milano Due - Palazzo Canova, 20054 Segrate (MI), Italia;

² Vetspin Srl, Via Arturo Toscanini, 9, 40055 Villanova di Castenaso (BO), Italia

Summary

Salmonella enterica serovar *Infantis* is currently the predominant serovar in European broiler production and represents a major challenge for poultry health and food safety. This study evaluated the effect of maternal immunity and coccidiosis control strategies on *S. Infantis* transmission in broiler chickens using a seeder model infection.

A total of 150 Ross 308 broilers were assigned to five experimental groups differing in breeder vaccination protocol and coccidiosis control strategy. Chicks originated from breeders vaccinated with an inactivated vaccine containing *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* (ET, groups T1, T3 and T5) or from breeders vaccinated with an inactivated vaccine including also *S. Infantis* (ETI, groups T2 and T4). Group T1 was the control group and didn't receive any treatment for coccidiosis, group T2 and T3 were treated with a coccidiostats, and T4 and T5 were vaccinated against coccidiosis. At 3 days of age, six birds per group were orally challenged with a field strain of *S. Infantis*, and transmission within each group was monitored through cloacal swabs (days 7, 8, 10, 11 and 12) and bacteriological analysis of liver, spleen, and ceca (days 13 and 14).

Broilers originated from ETI breeders showed a significantly lower *S. Infantis* isolation from cloacal swabs on days 8, 10, 11 and 12 ($p < 0.001$) and from liver samples ($p = 0.027$), indicating a protective effect of maternally derived immunity. Coccidiosis treatments showed only sporadic and inconsistent effects on *S. Infantis* colonization and shedding.

These findings suggest that the use of an inactivated *S. Infantis* vaccine in breeders could reduce early intestinal colonization and dissemination of *S. Infantis* in broiler progeny. Further studies are needed to evaluate integrated control strategies to combine maternal immunity with microbiota-modulating approaches, such as probiotics and prebiotics, to improve the control of *S. Infantis* in poultry production.

INTRODUZIONE

La salmonellosi rappresenta una delle principali zoonosi alimentari a livello europeo, la seconda più notificata nel 2024. In questo contesto, *Salmonella enterica* sierovar *Infantis* (*S. Infantis*) riveste un ruolo di crescente importanza, essendo il quarto sierovar più frequentemente associato alle infezioni umane nell'Unione Europea e il sierovar predominante nella filiera broiler-carne di pollo (EFSA e ECDC, 2025). Inoltre, negli ultimi anni si è assistito alla diffusione di ceppi di *S. Infantis* multiresistenti, spesso associati al megaplasmide pESI-like, che contribuisce alla persistenza e alla diffusione di determinanti di resistenza antimicrobica lungo la filiera alimentare (Alba *et al.*, 2020; Newton *et al.*, 2020; Georganas *et al.*, 2024).

Un controllo efficace di *S. Infantis* negli allevamenti avicoli rappresenta pertanto una

priorità per la tutela della salute pubblica. Tuttavia, nonostante le misure di contenimento adottate lungo la filiera produttiva, il sierovar rimane ampiamente diffuso negli allevamenti di polli da carne in Italia e in altri Paesi europei, per i quali la riduzione della prevalenza di *S. Infantis* continua a rappresentare una sfida rilevante. È pertanto verosimile che un controllo efficace di *S. Infantis* richieda l'applicazione integrata di più misure di biosicurezza e contenimento (EFSA e ECDC, 2025).

In quest'ottica, appare necessario approfondire il ruolo dei fattori in grado di influenzare la suscettibilità degli animali alla colonizzazione intestinale e alla diffusione dell'infezione.

Diversi studi hanno evidenziato come la presenza di immunità materna specifica, così come la composizione del microbiota intestinale, possano influenzare la colonizzazione e la replicazione intestinale di diversi sierovar di *Salmonella enterica*. Vaccinando i riproduttori, infatti, si trasferisce alla progenie una immunità passiva che protegge gli animali nelle prime settimane di vita (Hassan e Curtiss, 1996). La trasmissione, in particolare di anticorpi che vengono trasferiti al tuorlo dell'uovo sotto forma di immunoglobuline Y (IgY), viene fortemente stimolata dalla vaccinazione con vaccini inattivati (Da Silva Teixeira *et al.*, 2022).

È stato inoltre ipotizzato che l'impiego di coccidiostatici possa modificare l'equilibrio della microflora intestinale, favorendo indirettamente la replicazione e la persistenza di *Salmonella* nel tratto gastrointestinale (Holmberg *et al.*, 1984; Volkova *et al.*, 2011; Mughini-Gras *et al.*, 2021).

Lo scopo di questo studio è valutare l'effetto dell'immunità materna specifica verso *S. Infantis* e delle due principali strategie di controllo della coccidiosi, rappresentate dall'impiego di coccidiostatici nel mangime e dalla vaccinazione, sulla diffusione di *S. Infantis* in polli da carne.

MATERIALI E METODI

Nello studio sono stati inclusi 150 pulcini da carne Ross 308 di un giorno di età. Novanta soggetti provenivano da riproduttori sottoposti a profilassi vaccinale per salmonellosi con tre dosi di vaccino vivo attenuato per *Salmonella Enteritidis* e *Typhimurium* e due richiami con vaccino inattivato per le stesse sierovarianti (riproduttori ET). I restanti 60 pulcini provenivano da riproduttori sottoposti al medesimo protocollo vaccinale, ma con richiami effettuati mediante vaccino inattivato per *Salmonella Enteritidis*, *Typhimurium* e *Infantis* (riproduttori ETI).

I pulcini sono stati identificati individualmente ed assegnati a cinque gruppi sperimentali di 30 soggetti ciascuno. I pulcini provenienti da riproduttori ET sono stati distribuiti nei gruppi T1, T3 e T5, quelli provenienti da riproduttori ETI sono stati assegnati ai gruppi T2 e T4.

I gruppi T2 e T3 hanno ricevuto, dal giorno 0 (D0) fino al termine dello studio, una dieta supplementata con monensin e nicarbazina (48 + 48 ppm). I gruppi T4 e T5 sono stati sottoposti, al D0, a vaccinazione spray per coccidiosi. Il gruppo T1, controllo negativo, non è stato sottoposto né a trattamento con coccidiostatici, né a vaccinazione per coccidiosi.

Al giorno -8 (D-8), prima dell'avvio della prova sperimentale, è stata verificata l'assenza di *Salmonella* spp. nei campioni ambientali (tamponi ambientali, acqua, mangime e lettiera). Analogamente, tutti i gruppi sono risultati negativi per *Salmonella* spp. ai tamponi cloacali raccolti al D0 (pool di 5 tamponi/gruppo).

Al giorno 3 (D3) è stato effettuato il challenge applicando un modello di infezione naturale (seeder model): sei pulcini per gruppo sono stati sottoposti a infezione sperimentale

mediante gavage orale con un ceppo di *Salmonella Infantis* (SI) di campo, alla dose di $1,1 \times 10^3$ UFC/animale, mentre gli altri soggetti appartenenti al gruppo si sono infettati per contatto con questi una volta iniziato lo shedding.

Nei giorni 7, 8, 10, 11 e 12 sono stati raccolti tamponi cloacali individuali da tutti i soggetti. Ai giorni 13 e 14 sono stati sacrificati 10 animali per gruppo e sono stati prelevati fegato, milza e ciechi.

I tamponi cloacali e gli organi sono stati refrigerati e conferiti entro 6 ore all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (sedi di Verona e Padova) per essere sottoposti ad analisi batteriologica per la rilevazione e la quantificazione di SI.

I risultati provenienti dai tamponi, suddivisi per giorno di campionamento, e dai campioni di ciascun tessuto prelevato post-mortem ai giorni 13 e 14, sono stati analizzati applicando un modello di regressione logistica con selezione stepwise basata sul criterio AIC. Sono stati valutati l'effetto della vaccinazione dei riproduttori (ET vs ETI), del sistema di controllo della coccidiosi (V vs C) e l'interazione tra i due fattori. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il software *Rcmdr: R Commander*, versione 2.9-5 del pacchetto R.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il protocollo di infezione sperimentale adottato è risultato molto efficiente e nel corso della prova hanno cominciato ad eliminare SI non solo i soggetti oggetto di challenge ma anche quelli a contatto.

L'andamento dell'eliminazione fecale (Grafico 1) e dell'isolamento dai campioni di fegato, milza e ciechi (Grafico 2) di SI ha evidenziato differenze tra i gruppi sperimentali principalmente in relazione al riproduttore di origine dei pulcini.

Grafico 1. Numero totale di tamponi cloacali positivi per SI per gruppo e giorno di campionamento.

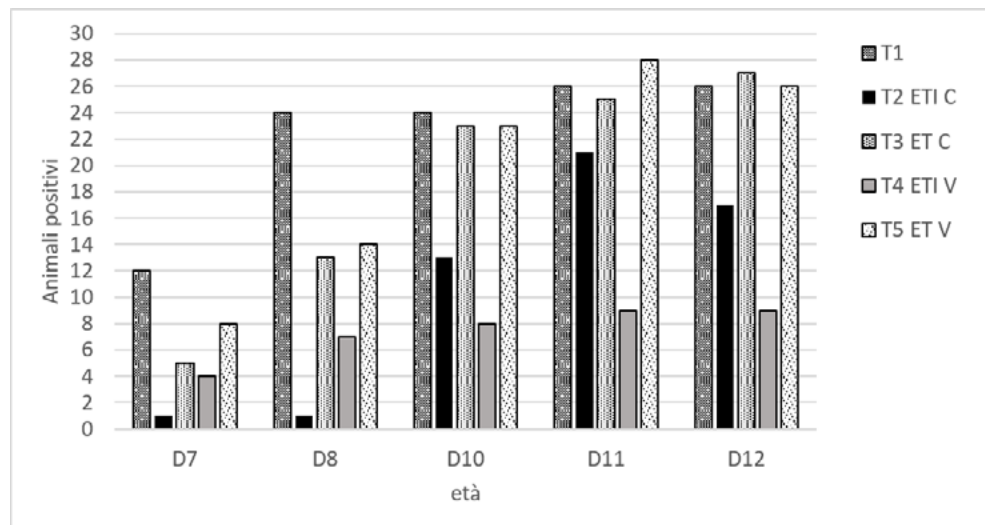
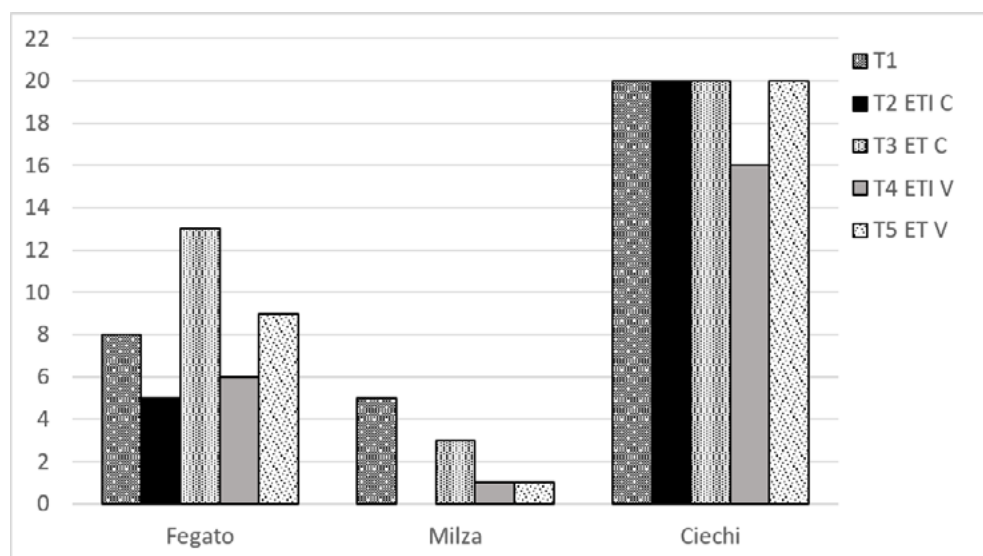


Grafico 2. Numero totale di matrici positive (fegato, milza e ciechi) per SI per gruppo.



Dall'analisi statistica è emerso che l'immunità materna ricevuta da riproduttori ETI è associata ad una riduzione dell'isolamento di SI sia da tamponi cloacali nei giorni 8, 10, 11 e 12 ($p < 0,001$) sia dal fegato ($p = 0,027$). Questo risultato suggerisce un effetto protettivo dell'immunità passiva derivante dalla vaccinazione dei riproduttori con vaccino inattivato contenente anche la valenza *S. Infantis*, come già riportato in letteratura per altri sierovar (Da Silva Teixeira *et.al*, 2022).

La vaccinazione per coccidiosi è risultata associata ad un ridotto isolamento di SI esclusivamente al giorno 8 ($p < 0,001$). Analogamente, l'interazione tra l'origine dei pulcini (ETI vs ET) e la vaccinazione per coccidiosi è risultata significativa soltanto al giorno 11 ($p = 0,009$). Poiché gli effetti statisticamente significativi del trattamento per coccidiosi non sono stati osservati in modo consistente nel corso dello studio, l'effetto della vaccinazione per coccidiosi è da considerarsi irrilevante.

È possibile ipotizzare a riguardo che eventuali effetti della vaccinazione per coccidiosi sul microbiota intestinale e conseguentemente sulla resistenza alla colonizzazione da *Salmonella* spp., riportati da altri autori, non siano stati riscontrati anche in funzione della brevità dello studio. I lavori precedenti avevano infatti valutato l'impatto del trattamento per coccidiosi a fine ciclo, mentre questo lavoro ha indagato solo i primi 14 giorni (Volkova *et al.*, 2011).

CONCLUSIONI

La vaccinazione dei riproduttori con un vaccino inattivato contenente le valenze per *S. Infantis*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* è risultata associata, in broiler infettati precocemente con *S. Infantis*, a una ridotta escrezione del patogeno durante le prime due settimane di vita. Al contrario, l'impiego di un vaccino vivo per la coccidiosi in alternativa al trattamento con coccidiostatico non ha evidenziato effetti rilevanti sulla colonizzazione e sulla diffusione del sierovar.

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano il potenziale interesse della vaccinazione dei riproduttori come strumento per limitare la diffusione precoce di *S. Infantis* nella progenie e

supportano l'opportunità di approfondire strategie integrate di controllo. Il microbiota intestinale svolge infatti un ruolo fondamentale nella resistenza alla colonizzazione da parte dei patogeni enterici, nella modulazione della risposta immunitaria e nel mantenimento dell'omeostasi intestinale (Kogut *et al.*, 2020). In tale contesto, diversi studi hanno dimostrato che l'impiego di probiotici, prebiotici o simbiotici può ridurre significativamente la colonizzazione intestinale e l'eliminazione ambientale di *Salmonella* spp. nei polli (Knap *et al.*, 2011; Murate *et al.*, 2015; Lamichhane *et al.*, 2024), sebbene tali effetti tendano a manifestarsi dopo un periodo necessario alla modulazione e stabilizzazione del microbiota intestinale. Pertanto, studi futuri potrebbero valutare l'efficacia di approcci combinati basati sulla vaccinazione dei riproduttori e sull'impiego di modulatori del microbiota. L'integrazione di strategie, in grado di agire sia nelle prime fasi di vita che nelle fasi successive dell'allevamento, potrebbe contribuire a ridurre la carica intestinale e ambientale di *S. Infantis*, limitandone la diffusione negli allevamenti e l'ingresso nella filiera di macellazione, con potenziali benefici per la sicurezza alimentare (Knap *et al.*, 2011; Shanmugasundaram *et al.*, 2019).

BIBLIOGRAFIA

1. Alba P, Leekitcharoenphon P, Carfora V, Amoruso R, Cordaro G, Di Matteo P, Ianzano A, Iurescia M, Diaconu EL, ENGAGE-EURL-AR Network Study Group, Pedersen SK, Guerra B, Hendriksen RS, Franco A and Battisti A. (2020). Molecular epidemiology of *Salmonella* *Infantis* in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. *Microbial Genomics* 6(5): e000365.
2. da Silva Teixeira M, Lages DH, Veiga Alves V, da Silva Martins NR and de Freitas Neto OC. (2022). Assessment of maternal immunity against *Salmonella* enterica serovar Heidelberg in progeny of broiler breeders vaccinated with different formulations of bacterins. *Avian Pathology* 51(2): 197-205.
3. EFSA and ECDC. (2025). The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 23, e9759.
4. Georganas A, Graziosi G, Catelli E and Lupini C. (2024). *Salmonella enterica* Sero-*var* *Infantis* in Broiler Chickens: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals* 14: 3453.
5. Hassan JO and Curtiss III R. (1996). Effect of Vaccination of Hens with an Avirulent Strain of *Salmonella* *Typhimurium* on Immunity of Progeny Challenged with Wild-Type *Salmonella* Strains. *Infection and Immunity*, Mar: 938-944.
6. Holmberg T, Wierup M and Engstrom B. (1984). The Effect of Feeding Diets Containing Avoparcin and Monensin on the Occurrence of *Salmonella* in Caecum and Liver in Experimentally Infected Chickens. *Poultry Science* 63: 1144-1148.
7. Knap I, Kehlet AB, Bennedsen M, Mathis GF, Hofacre CL, Lumpkins BS, Jensen MM, Raun M and Lay A. (2011). *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poultry Science* 90(8): 1690-1694.
8. Kogut MH, Lee A and Santin E. (2020). Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poultry Science* 99:1906-1913.
9. Lamichhane B, Mawad AMM, Saleh M, Kelley WG, Harrington PJ II, Lovestad CW, Amezcua J, Sarhan MM, El Zowalaty ME, Ramadan H, Morgan M and Helmy YA. (2024). Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics* 13(1):76.
10. Mughini-Gras L, van Hoek HAMA, Cuperus T, Dam-Deisz C, van Overbeek W, van den Beld M, Wit B, Rapallini M, Wullings B, Franz E, van der Giessen J, Dierikx C and Opsteegh M. (2021). Prevalence, risk factors and genetic traits of *Salmonella* *Infantis* in Dutch broiler flocks. *Veterinary Microbiology* 258: 109120.

11. Murate LS, Paião FG, de Almeida AM, Berchieri A Jr. and Shimokomaki M. (2015). Efficacy of Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics on Laying Hens and Broilers Challenged with *Salmonella* Enteritidis. *J. Poult. Sci.* 52: 52-56.
12. Newton K, Gosling B, Rabie A and Davies R. (2020). Field investigations of multi-drug-resistant *Salmonella* Infantis epidemic strain incursions into broiler flocks in England and Wales. *Avian Pathology* 49(6): 631-641.
13. Shanmugasundaram R, Mortada M, Cosby DE, Singh M, Applegate TJ, Syed B, Pender CM, Curry S, Murugesan GR and Selvaraj RK. (2019) Synbiotic supplementation to decrease *Salmonella* colonization in the intestine and carcass contamination in broiler birds. *PLoS ONE* 14(10): e0223577. Volkova VV, Wills RW, Hubbard SA, Magee D, Byrd JA and Bailey RH. (2011). Associations between vaccinations against protozoal and viral infections and *Salmonella* in broiler flocks. *Epidemiol. Infect.* 139: 206-215.

PIGMENTAZIONE CUTANEA DEL BROILER COME INDICATORE DI COCCIDIOSI: VALUTAZIONE IN VIVO E CONFRONTO CON METODICHE GOLD STANDARD

Tomasoni R.¹, Catelli E.¹, Poluzzi A.², Anfossi P.², Lupini C.¹

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

² Vetspin Srl, via Toscanini, 9 40055, Villanova di Castenaso (BO)

Summary

Avian coccidiosis caused by *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* impairs intestinal nutrient absorption and carcass pigmentation, representing a major economic concern in broiler production. In this study, 840 one-day-old Ross 308 broilers were challenged at D14 with graded doses (none, low, medium, high) of *E. acervulina* and *E. maxima*, comparing body weight, Feed Conversion Rate (FCR), intestinal lesion scoring and faecal oocyst shedding with skin and breast muscle colorimetry (CIELab b* parameter) as an indicator of carcass pigmentation.

Body weight and FCR were significantly impaired in infected groups from D20 onward, most markedly between D13 and D20. Skin and muscle b* values were consistently and significantly lower in infected groups at all time points, and colorimetry remained discriminant even at D28, when *E. maxima* lesion scores no longer differed between groups, particularly in muscle tissue. Skin and muscle pigmentation showed complementary kinetics, with skin more responsive in the acute phase and muscle more informative later on.

These results support colorimetry as an objective, non-invasive tool, complementary to traditional diagnostic methods, for monitoring the impact of coccidial infection on carcass quality.

INTRODUZIONE

La coccidiosi aviaria è una delle patologie parassitarie di maggiore impatto economico nell'industria avicola mondiale (Blake *et al.*, 2020). Essa è causata da protozoi intracellulari del genere *Eimeria*, di cui sette specie sono patogene per il pollo da carne. Tra queste, *Eimeria acervulina* ed *Eimeria maxima* rivestono particolare importanza per la loro ampia diffusione e per il loro impatto sulla produttività degli allevamenti (Williams, 1998). *E. acervulina* colonizza il duodeno e il digiuno prossimale causando lesioni caratteristiche e riduzione dell'assorbimento dei nutrienti, mentre *E. maxima* colpisce il digiuno e l'ileo, provocando enterite essudativa con marcata compromissione dell'assorbimento dei carotenoidi (McDougald, 2008).

L'infezione da *Eimeria* compromette l'assorbimento intestinale di pigmenti carotenoidici, responsabili della caratteristica colorazione gialla della cute e del muscolo nei polli da carne. Tale alterazione della pigmentazione rappresenta un danno economico rilevante in quanto la colorazione della carcassa costituisce un importante parametro qualitativo e commerciale (Pérez-Vendrell *et al.*, 2001). La valutazione tradizionale della coccidiosi si avvale del *lesion scoring* intestinale, un metodo semiquantitativo ampiamente consolidato (Johnson e Reid, 1970), che tuttavia presenta alcune limitazioni in termini di oggettività e applicabilità a livello di macello, affiancato dal monitoraggio delle *performance* zootecniche quali il peso corporeo e l'indice di conversione alimentare (FCR).

La colorimetria, mediante l'impiego di colorimetri portatili che misurano i parametri dello spazio cromatico CIELab (L*, a*, b*), rappresenta un approccio oggettivo, non invasivo e

rapidamente applicabile per la valutazione della pigmentazione della cute e del muscolo. Questa metodica potrebbe costituire uno strumento complementare o alternativo alle metodiche tradizionali di diagnosi e monitoraggio della coccidiosi, offrendo la possibilità di una valutazione standardizzata e riproducibile delle alterazioni cromatiche indotte dall'infezione. Nel presente studio polli da carne sono stati infettati sperimentalmente con dosi scalari di *E. acervulina* ed *E. maxima* (nessuna, bassa, media e alta) al fine di valutare l'effetto dell'infezione sulle performance produttive, sulle lesioni intestinali e sulla colorazione della cute e del muscolo, confrontando la colorimetria con le metodiche tradizionali.

MATERIALI E METODI

Al primo giorno di vita 840 polli broiler Ross 308 sono stati suddivisi in 40 box a terra con 21 animali ciascuno e disposti in due file da 20 box (fronte a fronte). Ogni box era dotato di abbeveratoi a goccia e una mangiatoia a piatto con serbatoio.

Gli animali hanno ricevuto mangime commerciale *ad libitum* secondo un programma trifasico: mangime *starter* (D0–D13), *grower* (D14–D27) e *finisher* (D28–D35). Le fasi *grower* e *finisher* erano arricchite con OddOro® ad una concentrazione di 74 mg/kg di carotenoidi nella razione finita, al fine di garantire un adeguato apporto di pigmenti xantofillici. Il peso del mangime fornito e quello residuo per box sono stati registrati a D14, D21, D28 e D35.

Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali (10 box per gruppo) secondo un disegno a blocchi randomizzati. I gruppi erano i seguenti:

- Non infetti: Gli animali hanno ricevuto per gavaggio orale un volume di acqua equivalente al volume dell'inoculo somministrato ai gruppi infettati.
- Bassa dose: 2.000 oocisti di *E. acervulina* + 500 oocisti di *E. maxima* per animale.
- Media dose: 10.000 oocisti di *E. acervulina* + 5.000 oocisti di *E. maxima* per animale.
- Alta dose: 20.000 oocisti di *E. acervulina* + 10.000 oocisti di *E. maxima* per animale.

Le oocisti di *E. acervulina* ed *E. maxima* utilizzate nello studio provenivano da isolati di campo e sono state somministrate come miscela di oocisti sporulate a dose nota. Al giorno 14 (D14) tutti gli animali dei gruppi sono stati infettati individualmente per gavaggio orale nel gozzo, mediante siringa con catetere, con circa 1,0 ml di sospensione in terreno di coltura. Precedentemente alla somministrazione dell'inoculo (D12) sono stati raccolti campioni fecali per verificare l'assenza di oocisti nei box prima dell'inoculo.

Il peso corporeo è stato rilevato per box nei giorni D0, D7, D14, D21, D28 e D35. Nei giorni di sacrificio programmato (D21, D28, D35), il peso dell'intero box è stato registrato prima della rimozione degli animali destinati alla necropsia, insieme al peso del sottogruppo rimosso. Il peso medio degli animali è stato calcolato per box e per periodo. L'indice di conversione alimentare è stato calcolato per i periodi: D0–D14, D14–D21, D21–D28, D28–D35 e D0–D35.

Il *lesion score* intestinale è stato valutato al D21 in 8 animali per box; mentre al D28 e D35 sono stati sacrificati e esaminati 5 soggetti per box. Le lesioni intestinali sono state valutate da personale qualificato secondo il sistema semiquantitativo di Johnson e Reid (1970), assegnando un punteggio da 0 (assenza di lesioni) a 4 (lesioni gravissime) separatamente per le lesioni tipiche di *E. acervulina* (duodeno e digiuno prossimale) ed *E. maxima* (digiuno e ileo).

La pigmentazione cutanea è stata misurata su 5 animali vivi per box al D21, D28 e D35, e sia su pelle che su muscolo negli animali sottoposti a *lesion scoring*. La misurazione è stata effettuata nella zona latero-pettorale apteriale destra, mediante colorimetro portatile CR-400 Konica Minolta, utilizzando il sistema di riferimento cromatico CIE (1978). I dati colorimetrici riportati nel presente lavoro si riferiscono al parametro b^* (componente giallo-blu), che rappresenta l'indice più direttamente correlato al contenuto di pigmenti xantofillici.

Campioni fecali per la conta delle oocisti per grammo di feci (OPG) sono stati raccolti per box al D12 e giornalmente dal D19 al D35. I campioni sono stati conservati in frigorifero a circa +4°C fino all'analisi. L'identificazione delle specie di *Eimeria* è stata effettuata sulla base della morfologia delle oocisti.

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via con il gruppo come fattore fisso. Le differenze tra gruppi sono state valutate con il test post hoc di Tukey HSD (Honestly Significant Difference). Le analisi sono state condotte con il software JASP (versione 0.18). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0.05$. I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard (DS).

RISULTATI

Il peso corporeo degli animali alla nascita (D0) e al giorno 13 (D13) era sovrapponibile in tutti i gruppi sperimentali, senza differenze statisticamente significative ($p = 0.631$ e $p = 0.248$, rispettivamente). A partire dal giorno 20 (D20), corrispondente al picco dell'infezione da *Eimeria*, il gruppo di controllo non infettato ha mostrato pesi corporei significativamente superiori rispetto a tutti i gruppi infettati ($p < 0.001$). Questa differenza si è mantenuta costante fino al sacrificio a D35 (Tabella 1). Tra i gruppi infettati, la dose bassa ha mostrato pesi intermedi rispetto ai gruppi dose media e dose alta a D20, mentre a D28 e D35 i tre gruppi infettati non differivano tra loro in modo statisticamente significativo.

Tabella 1. Peso corporeo medio (kg $\pm$ DS) ai diversi giorni di valutazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$, test di Tukey HSD).

Gruppo	D0	D13	D20	D28	D35
Non infetti	0.046 $\pm$ 0.00	0.492 $\pm$ 0.01	1.037 $\pm$ 0.04a	1.892 $\pm$ 0.07a	2.506 $\pm$ 0.10a
Dose bassa	0.046 $\pm$ 0.00	0.481 $\pm$ 0.06	0.940 $\pm$ 0.08b	1.554 $\pm$ 0.10b	2.301 $\pm$ 0.10b
Dose media	0.046 $\pm$ 0.00	0.511 $\pm$ 0.02	0.871 $\pm$ 0.03c	1.510 $\pm$ 0.07b	2.209 $\pm$ 0.13b
Dose alta	0.046 $\pm$ 0.00	0.498 $\pm$ 0.03	0.840 $\pm$ 0.03c	1.460 $\pm$ 0.07b	2.216 $\pm$ 0.11b
p (ANOVA)	0.631	0.248	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Indice di Conversione Alimentare (FCR)

Nel periodo D0–D13 non sono state rilevate differenze significative tra i gruppi nel FCR ($p = 0.880$). Nel periodo D13–D20, corrispondente alla fase acuta dell'infezione, il FCR è risultato significativamente più elevato nei gruppi infettati rispetto al controllo, con un effetto dose-dipendente: dose bassa (1.533 $\pm$ 0.14), dose media (1.914 $\pm$ 0.24) e dose alta (2.067 $\pm$ 0.18) hanno mostrato un peggioramento progressivo rispetto ai non infetti (1.318 $\pm$ 0.06) ($p < 0.001$). Nel periodo D20–D28 le differenze sono rimaste significative ($p = 0.007$), con dose bassa significativamente più alto rispetto al controllo, mentre dose media e dose alta non differivano statisticamente da non infetti e dose bassa. Nel periodo D28–D35 il gruppo di controllo non infetto ha mostrato il valore di FCR più elevato (2.358 $\pm$ 0.45). Complessivamente (D0–D35), il FCR è risultato significativamente superiore in tutti i gruppi infettati rispetto al controllo ($p = 0.001$) (Tabella 2).

Tabella 2. Indice di Conversione Alimentare (FCR, media $\pm$ DS) nei diversi periodi di valutazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$, test di Tukey HSD).

Gruppo	D0–D13	D13–D20	D20–D28	D28–D35	D0–D35
Non infetti	1.221 $\pm$ 0.11	1.318 $\pm$ 0.06a	1.406 $\pm$ 0.04a	2.358 $\pm$ 0.45a	1.423 $\pm$ 0.06a
Dose bassa	1.219 $\pm$ 0.13	1.533 $\pm$ 0.14b	1.792 $\pm$ 0.12b	1.959 $\pm$ 0.17b	1.555 $\pm$ 0.07b
Dose media	1.194 $\pm$ 0.07	1.914 $\pm$ 0.24c	1.647 $\pm$ 0.36ab	1.876 $\pm$ 0.28b	1.583 $\pm$ 0.11b
Dose alta	1.187 $\pm$ 0.14	2.067 $\pm$ 0.18d	1.636 $\pm$ 0.26ab	1.840 $\pm$ 0.17b	1.613 $\pm$ 0.09b
p (ANOVA)	0.880	< 0.001	0.007	0.001	0.001

Lesion Scoring intestinale

Eimeria acervulina

Al giorno 20 (Tabella 3), il gruppo non infetto ha mostrato un *lesion score* pressoché nullo (0.041 ± 0.095), a conferma dell'assenza di infezione nel gruppo di controllo. Il gruppo dose bassa ha presentato il *lesion scoring* più elevato (1.588 ± 0.277), seguito da dose media (0.813 ± 0.345) e dose alta (0.859 ± 0.341), che non differivano significativamente tra loro. Al giorno 28 il gruppo di controllo non infetto ha mostrato il punteggio più elevato (1.455 ± 0.261), significativamente superiore a tutti i gruppi infettati ($p < 0.001$), che presentavano *scores* molto ridotti (dose bassa: 0.220, dose media: 0.270, dose alta: 0.240). Al D35, i *lesion scores* erano prossimi allo zero in tutti i gruppi ($p = 0.003$).

Tabella 3. *Lesion score* intestinale per *E. acervulina* (media $\pm$ DS) ai diversi giorni di valutazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$, test di Tukey HSD).

Gruppo	D20	D28	D35
Non infetti	0.041 $\pm$ 0.095a	1.455 $\pm$ 0.261a	0.250 $\pm$ 0.252a
Dose bassa	1.588 $\pm$ 0.277b	0.220 $\pm$ 0.274b	0.050 $\pm$ 0.113ab
Dose media	0.813 $\pm$ 0.345c	0.270 $\pm$ 0.258b	0.050 $\pm$ 0.113ab
Dose alta	0.859 $\pm$ 0.341c	0.240 $\pm$ 0.207b	0.000 $\pm$ 0.000b
p (ANOVA)	< 0.001	< 0.001	0.003

Eimeria maxima

Al D20 è stato osservato un chiaro effetto dose-dipendente: non infetti = 0.141 ± 0.161 , dose bassa = 2.363 ± 0.443 , dose media = 3.288 ± 0.289 , dose alta = 3.236 ± 0.377 ($p < 0.001$). A D28 e D35 non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p = 0.816$ e $p = 0.125$ rispettivamente) (Tabella 4).

Tabella 4. *Lesion score* intestinale per *E. maxima* (media $\pm$ DS) ai diversi giorni di valutazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$, test di Tukey HSD).

Gruppo	D20	D28	D35
Non infetti	0.141 $\pm$ 0.161a	0.985 $\pm$ 0.564	1.083 $\pm$ 0.362
Dose bassa	2.363 $\pm$ 0.443b	1.100 $\pm$ 0.271	0.870 $\pm$ 0.295
Dose media	3.288 $\pm$ 0.289c	1.170 $\pm$ 0.457	0.730 $\pm$ 0.177
Dose alta	3.236 $\pm$ 0.377c	1.080 $\pm$ 0.380	0.917 $\pm$ 0.408
p (ANOVA)	< 0.001	0.816	0.125

Pigmentazione della cute

I valori colorimetrici della cute (Tabella 5) hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi in tutti i giorni di valutazione ($p < 0.001$). Il gruppo di controllo non infetto ha presentato i valori più elevati a tutti i *time points* (D20: 14.08 $\pm$ 1.05; D28: 17.44 $\pm$ 1.48; D35: 17.70 $\pm$ 1.23), indicando una maggiore intensità di pigmentazione rispetto ai gruppi infettati. Al D20, i valori dei gruppi infettati si sono ridotti in modo dose-dipendente: dose bassa = 11.89 $\pm$ 0.61, dose media = 10.94 $\pm$ 0.94, dose alta = 10.30 $\pm$ 0.76. Al D28 e D35, i tre gruppi infettati non differivano statisticamente tra loro ma mostravano tutti valori significativamente inferiori rispetto al controllo.

Tabella 5. Valori colorimetrici della cute (media $\pm$ DS) ai diversi giorni di valutazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$, test di Tukey HSD).

Gruppo	D20	D28	D35
Non infetti	14.08 $\pm$ 1.05a	17.44 $\pm$ 1.48a	17.70 $\pm$ 1.23a
Dose bassa	11.89 $\pm$ 0.61b	10.90 $\pm$ 1.00b	13.72 $\pm$ 2.07b
Dose media	10.94 $\pm$ 0.94bc	10.48 $\pm$ 0.74b	13.34 $\pm$ 1.66b
Dose alta	10.30 $\pm$ 0.76c	9.99 $\pm$ 0.64b	13.86 $\pm$ 0.97b
p (ANOVA)	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Pigmentazione del muscolo

I valori colorimetrici del muscolo pettorale (Tabella 6) hanno evidenziato differenze statisticamente significative in tutti i *time points* ($p < 0.001$). Analogamente a quanto osservato per la cute, il gruppo non infetto ha mostrato i valori più elevati (D20: 9.75 $\pm$ 0.74; D28: 11.37 $\pm$ 1.98; D35: 10.47 $\pm$ 0.98). Al D20, la differenza tra controllo e gruppi infettati era già significativa ma di entità più contenuta rispetto ai *time points* successivi. Al D28, si è osservata la massima divergenza tra il controllo e i gruppi infettati, con dose media e dose alta, che mostravano i valori inferiori (5.31 $\pm$ 0.69 e 4.96 $\pm$ 0.72, rispettivamente), significativamente più bassi anche rispetto a dose bassa (6.71 $\pm$ 1.06). Al D35, tutti i gruppi infettati mantenevano valori significativamente inferiori al controllo, senza differenze significative.

Tabella 6. Valori colorimetrici del muscolo pettorale (media $\pm$ DS) ai diversi giorni di valutazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi ($p < 0.05$, test di Tukey HSD).

Gruppo	D20	D28	D35
Non infetti	9.75 $\pm$ 0.74a	11.37 $\pm$ 1.98a	10.47 $\pm$ 0.98a
Dose bassa	8.57 $\pm$ 0.62b	6.71 $\pm$ 1.06b	6.22 $\pm$ 1.29b
Dose media	8.80 $\pm$ 0.47b	5.31 $\pm$ 0.69c	5.84 $\pm$ 0.61b
Dose alta	8.41 $\pm$ 0.67b	4.96 $\pm$ 0.72c	6.25 $\pm$ 1.41b
p (ANOVA)	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Curve di escrezione delle oocisti nelle feci
 L’andamento dell’escrezione fecale delle oocisti nei diversi gruppi sperimentali, espresso come OPG medi per gruppo nel corso del periodo sperimentale, è riportato nella Figura 1 per *E. acervulina* e nella Figura 2 per *E. maxima*.

Figura 1. Curva di escrezione delle oocisti per *E. acervulina*.

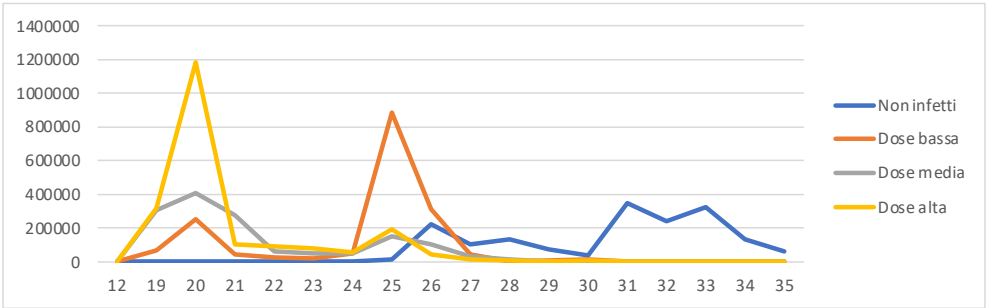
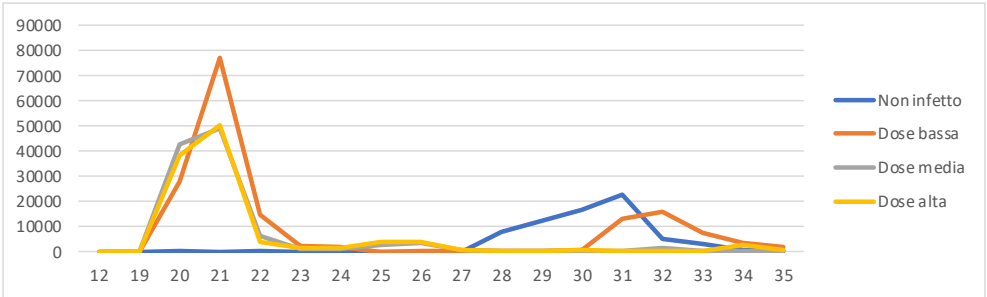


Figura 2. Curva di escrezione delle oocisti per *E. maxima*.



DISCUSSIONE

La riduzione del peso corporeo osservata a partire da D20 nei gruppi infetti è coerente con i meccanismi patogenetici noti di entrambe le specie impiegate: la compromissione della mucosa intestinale determinata da *E. acervulina* ed *E. maxima* riduce la capacità di assorbimento dei nutrienti, con conseguente rallentamento dell'accrescimento (Williams, 1998; Blake *et al.*, 2020). Il confronto tra i gruppi infetti a D20 evidenzia un andamento dose-correlato che si attenua progressivamente nei *time points* successivi: a D28 e D35 le differenze tra i gruppi infetti non raggiungono la significatività statistica, indicando che anche la dose minima impiegata nello studio è sufficiente a produrre un impatto produttivo di entità paragonabile a quello delle dosi più elevate. Questo dato suggerisce che anche le forme subcliniche di coccidiosi, pur non producendo segni clinici, possano determinare perdite produttive di rilievo economico.

L'analisi del FCR per periodo ha permesso di identificare con precisione la finestra temporale di massimo impatto dell'infezione: nel periodo D13–D20 si è osservato un gradiente di peggioramento perfettamente dose-correlato, con quattro livelli statisticamente distinti. Tale pattern indica che il FCR misurato nella settimana immediatamente successiva all'inoculo costituisce l'indicatore produttivo più sensibile per quantificare l'effetto dell'infezione coccidica in un modello sperimentale, in accordo con quanto riportato da McDougald (2008) riguardo alla correlazione tra intensità dell'infezione e compromissione dell'efficienza alimentare.

Il valore di FCR più elevato osservato nel gruppo non infetto nel periodo D28–D35 è riconducibile ad una contaminazione crociata ambientale avvenuta per prossimità tra i box: si può ipotizzare che gli animali del gruppo di controllo, esposti alle oocisti disperse nell'ambiente dai gruppi infettati, abbiano presentato a D28–D35 un'infezione in fase acuta con conseguente compromissione della efficienza alimentare. Tale fenomeno rappresenta un rischio intrinseco al disegno sperimentale adottato, in cui la prossimità fisica tra i box è necessaria per garantire condizioni di crescita omogenee tra i gruppi, ed è pienamente confermato dall'andamento delle curve di escrezione delle oocisti.

Le curve di escrezione delle oocisti hanno fornito un elemento interpretativo essenziale per la comprensione dei risultati del *lesion scoring*, consentendo di ricostruire la cronologia dell'infezione nei diversi gruppi.

Per *E. acervulina*, i gruppi infettati sperimentalmente hanno presentato il picco di escrezione primario tra D19 e D21, confermando che a D20 l'infezione era nel pieno della sua fase replicativa. Successivamente, in tutti e tre i gruppi infettati è stato osservato un secondo picco di escrezione a distanza di circa una settimana dal primo (D25–D26), compatibile con un secondo ciclo replicativo endogeno del parassita. L'entità di questo secondo picco, tuttavia, è risultata inversamente correlata alla dose di inoculo: nel gruppo a dose bassa il secondo picco è stato particolarmente netto, superando persino il valore del picco primario, mentre nei gruppi a dose media e alta l'incremento a D25–D26 è stato di entità molto più contenuta, quasi impercettibile rispetto ai valori di escrezione già elevati raggiunti nella fase primaria. Questo gradiente suggerisce che l'intensità della risposta immunitaria acquisita, verosimilmente più rapida e più efficace alle dosi di inoculo più elevate, abbia limitato in modo dose-dipendente la replicazione parassitaria nel secondo ciclo, mentre alla dose più bassa una stimolazione immunitaria meno intensa avrebbe permesso una replicazione endogena secondaria pressoché priva di ostacoli.

Il *lesion score* a D20, pur confermando l'infezione in tutti i gruppi infettati, ha mostrato un andamento paradossale se paragonato alla escrezione delle oocisti: il gruppo a dose bassa ha presentato le lesioni più gravi, a fronte dei gruppi a dose media e alta che, pur con cariche parassitarie notevolmente superiori, hanno mostrato punteggi significativamente inferiori. La spiegazione più plausibile di questo pattern risiede nella competizione interspecifica tra

E. acervulina ed *E. maxima* per l'epitelio intestinale: il gruppo a dose bassa aveva ricevuto un inoculo di *E. maxima* dieci e venti volte inferiore rispetto ai gruppi a dose media e alta rispettivamente, lasciando potenzialmente disponibile una maggiore estensione di mucosa duodenale per la replicazione di *E. acervulina*. In alternativa, o in modo complementare, l'intensa risposta immunitaria innata stimolata dall'inoculo combinato ad alte dosi potrebbe aver contribuito a limitare precocemente la replicazione parassitaria intestinale in quei gruppi (Dalloul e Lillehoj, 2006) — un meccanismo peraltro coerente con la minore ampiezza del secondo picco di escrezione osservata alle dosi più elevate.

I dati del *lesion score* a D28, che presentano i punteggi più elevati nel gruppo non infetto, trova una spiegazione diretta e coerente nei dati di escrezione delle oocisti. Questo gruppo ha iniziato a eliminare *E. acervulina* in modo significativo a partire da D26, con un picco che si è protratto fino a D31–D33, confermando che al momento del secondo scoring il gruppo di controllo si trovava nel pieno della fase replicativa di un'infezione ambientale contratta per contaminazione crociata, avvenuta circa 10–12 giorni prima per dispersione delle oocisti dai box adiacenti. Si tratta, a differenza del secondo picco endogeno osservato nei gruppi infettati sperimentalmente, di un ciclo infettivo primario, semplicemente sfasato nel tempo. I gruppi infettati sperimentalmente presentavano invece a D28 un'escrezione prossima allo zero, a conferma della risoluzione pressoché completa del loro ciclo infettivo secondario.

Per *E. maxima*, la dinamica di escrezione delle oocisti non si sovrappone quanto osservato per *E. acervulina*. Il picco primario, comune a tutti i gruppi infettati, si è collocato tra D20 e D21; un secondo picco, atteso in analogia al pattern di *E. acervulina*, si è manifestato in modo nettamente diverso in funzione della dose: nel gruppo a dose bassa è comparso un secondo picco ben distinto e di entità rilevante attorno a D31–D33, mentre nei gruppi a dose media e alta l'incremento nello stesso periodo è risultato minimo, quasi impercettibile rispetto ai valori di fondo. Questa divergenza rispetto ad *E. acervulina* suggerisce che, per *E. maxima*, l'immunità acquisita alle dosi media e alta sia stata sufficientemente rapida ed efficace da sopprimere quasi completamente un'eventuale replicazione endogena secondaria, mentre alla dose bassa la stimolazione immunitaria più contenuta avrebbe permesso, come per *E. acervulina*, un secondo ciclo replicativo di entità apprezzabile. La stessa dinamica di contaminazione crociata nel gruppo di controllo è confermata dall'andamento delle oocisti fecali, con il gruppo non infetto che ha mostrato escrezione rilevante solo a partire da D28–D29, in accordo con il periodo di prepatenza più lungo caratteristico di questa specie. L'assenza di differenze significative nel *lesion score* a D28 e D35 nei gruppi infettati sperimentalmente indica una rapida risoluzione delle lesioni acute indipendente dalla dose inoculata, che avviene in modo parallelo alla progressione dell'infezione naturale nel gruppo non infetto.

I risultati colorimetrici costituiscono l'aspetto più innovativo del presente studio. La riduzione del parametro b^* , espressione della componente gialla dello spazio cromatico CIELab e indice diretto del contenuto di pigmenti xantofillici nei tessuti, è stata osservata in maniera sistematica e altamente significativa in tutti i gruppi infettati rispetto al controllo, sia a livello cutaneo che muscolare, in tutti i *time points* considerati. La base biologica di questo fenomeno risiede nella compromissione dell'assorbimento intestinale dei carotenoidi: le lesioni indotte da *E. acervulina* ed *E. maxima* a carico del piccolo intestino riducono l'assorbimento delle xantofille alimentari, limitandone l'accumulo nei tessuti bersaglio (Pérez-Vendrell *et al.*, 2001).

Un aspetto di particolare interesse emerge dal confronto tra i risultati colorimetrici e il *lesion scoring* a D28. Mentre quest'ultimo non ha rilevato differenze significative tra i gruppi per *E. maxima* ($p = 0.816$), la colorimetria del muscolo ha mantenuto una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di controllo e tutti i gruppi infettati, con dose media e dose alta significativamente inferiori anche alla dose bassa. Questo dimostra che la colorimetria è in gra-

do di rilevare gli effetti cumulativi dell'infezione sull'assorbimento dei pigmenti anche oltre la risoluzione delle lesioni macroscopicamente evidenti, configurandosi come uno strumento diagnostico complementare capace di intercettare le conseguenze funzionali dell'infezione in una finestra temporale in cui il *lesion scoring* perde di sensibilità.

Dal confronto tra cute e muscolo emerge una diversa cinetica di risposta alla riduzione dell'assorbimento delle xantofille. La cute ha mostrato a D20 la capacità di separare quattro livelli dose-correlati, risultando più sensibile nella fase acuta, probabilmente in ragione di una maggiore rapidità di risposta alle variazioni di assorbimento intestinale. Il muscolo, al contrario, ha mostrato una differenza dose-dipendente meno evidente a D20 ma più marcata a D28, suggerendo una dinamica di accumulo e deplezione dei pigmenti più lenta ma più persistente, che si rivela diagnosticamente più informativa nelle fasi tardive dell'infezione.

È infine rilevante osservare che il gruppo di controllo non infetto, nonostante la contaminazione crociata ambientale documentata dalla curva di escrezione oocistica, ha mostrato un incremento progressivo dei valori di b^* dall'inoculo fino a D35 in entrambi i tessuti, mantenendosi sempre significativamente superiore ai gruppi infettati sperimentalmente. Questo dato indica che l'infezione naturale tardiva subita dai non infetti, per quanto documentata dall'escrezione oocistica, non ha prodotto un impatto sull'assorbimento dei carotenoidi paragonabile a quello dell'infezione sperimentale diretta, verosimilmente per effetto della minore carica parassitaria ambientale e del ritardo temporale rispetto all'inoculo, che ha permesso agli animali non infetti di accumulare una maggiore riserva di pigmenti nei tessuti prima dell'esposizione. Questo rafforza ulteriormente il potenziale della colorimetria come strumento sensibile per rilevare e quantificare le conseguenze dell'infezione coccidica sulla qualità della carcassa, con possibili applicazioni sia in allevamento che in sede di macellazione.

CONCLUSIONI

Il presente studio dimostra che l'infezione sperimentale con dosi scalari di *E. acervulina* ed *E. maxima* produce alterazioni significative e dose-correlate delle performance produttive e della qualità della carcassa nel pollo da carne, con effetti rilevabili già alla dose di inoculo più bassa. I dati di escrezione delle oocisti si sono rivelati un elemento interpretativo indispensabile, consentendo di ricostruire la cronologia dell'infezione nei diversi gruppi e di spiegare l'andamento del *lesion scoring* in modo più solido rispetto alla sola valutazione macroscopica delle lesioni intestinali. La colorimetria cutanea e muscolare si è dimostrata una metodica sensibile, oggettiva e capace di rilevare le conseguenze funzionali dell'infezione sull'assorbimento dei carotenoidi anche oltre la risoluzione delle lesioni acute, risultando complementare e, in alcuni contesti superiore, al *lesion scoring* nella capacità di discriminazione tra i gruppi. La diversità di risposta osservata nella cute e nel muscolo suggerisce che i due tessuti forniscano informazioni complementari e che la loro valutazione combinata possa aumentare il potere diagnostico della metodica colorimetrica.

Alla luce di questi risultati, la colorimetria cutanea potrebbe essere un valido parametro aggiuntivo da impiegare nei modelli sperimentali volti a testare l'efficacia di sostanze naturali e additivi zootecnici nel controllo della coccidiosi e del relativo impatto sulle produzioni. I modelli di infezione sperimentale con coccidi a basse dosi, spesso utilizzati per simulare condizioni subcliniche di campo, tendono a non produrre segni clinici evidenti (arruffamento del piumaggio, letargia, mortalità), rendendo difficile verificare le differenze tra gruppi infetti e di controllo. Il fatto che, anche alla dose più bassa impiegata nel presente studio, la colorimetria abbia rilevato una riduzione significativa della pigmentazione cutanea e muscolare, in una finestra temporale in cui il *lesion score* risultava già contenuto o in rapida risoluzione, suggerisce che questa metodica possa rappresentare uno strumento sensibile da esplorare ulteriormente in tale contesto.

Un ulteriore aspetto di interesse riguarda la possibilità di eseguire la misurazione colorimetrica cutanea in vivo e in modo ripetuto sullo stesso animale nel tempo, a differenza del *lesion score*, che richiede necessariamente il sacrificio di sottogruppi distinti ad ogni time point di valutazione. Questa caratteristica potrebbe consentire l'adozione di disegni sperimentali a misure ripetute, con una conseguente riduzione del numero di animali necessari per ottenere una potenza statistica adeguata, in linea con il principio della *Reduction* previsto dalle 3R (Replacement, Reduction, Refinement) nella sperimentazione animale.

Va tuttavia sottolineato che la misurazione colorimetrica è influenzata da diverse variabili indipendenti dalla infezione con coccidi, quali la razza, il sesso e il contenuto di xantofille della dieta, che possono modulare la pigmentazione basale della cute indipendentemente dalla presenza di infezione. Nell'applicazione di questo approccio sarà pertanto necessario porre particolare attenzione alla standardizzazione di tali variabili tra i gruppi sperimentali, al fine di garantire che le differenze colorimetriche osservate siano effettivamente attribuibili all'infezione e non a fattori confondenti. Ulteriori studi dovranno inoltre validare questo approccio in condizioni di campo e definirne le soglie diagnostiche ottimali.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen P.C., Danforth H.D., Augustine P.C. (1998) Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol.* 28(7):1131-40.
2. Blake D.P., Knox J., Dehaeck B., Huntington B., Rathinam T., Ravipati V., Ayoade S., Gilbert W., Adebambo A.O., Jatau I.D., Raman M., Parker D., Rushton J., Tomley F.M. (2020) Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet Res.* 51(1):115.
3. Dalloul R.A., Lillehoj H.S. (2006) Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 5(1):143-163.
4. Johnson J., Reid W.M. (1970) Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol.* 28(1):30-36.
5. McDougald L.R. (2008) Intestinal protozoa important to poultry. *Poult Sci.* 87(10):2023-2026.
6. Pérez-Vendrell A.M., Hernández J.M., Llauradó L., Schierle J., Brufau J. (2001) Influence of source and ratio of xanthophyll pigments on broiler chicken pigmentation and performance. *Poult Sci.* 80(3):320-326.
7. Williams R.B. (1998) Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int J Parasitol.* 28(7):1089-1098.

CONFRONTO TRA CAMPIONAMENTO CONVENZIONALE E CAMPIONAMENTO DELL'ARIA PER LA RILEVAZIONE MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV)

Tonellato F.R.¹, Poletto F.¹, Andolfatto C.¹, Franzo G.¹, Tucciarone C.M.¹, Cecchinato M.¹, Legnardi M.¹

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

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is an immunosuppressive pathogen of chickens that is highly resistant in the environment and susceptible to frequent mutations and reassortment events. Despite the widespread use of vaccination, surveillance remains essential to monitor the circulation of field strains and to evaluate the effectiveness of implemented vaccination programs.

This study compared traditional sampling of the bursa of Fabricius with a non-invasive approach based on air sampling using an air collector. A total of 50 broiler and pullet flocks were analyzed by qRT-PCR for generic IBDV detection and specifically for genogroup A3, integrating results with sequencing performed on bursa samples that tested positive by RT-PCR.

The results showed a high qualitative agreement between the two sample types, as the relative sensitivity and specificity of air sampling were respectively equal to 93.6% and 100% for generic qRT-PCR, and 77.8% and 96.9% for the A3-specific assay. On the other hand, air samples showed significantly higher Ct values for both assays, whose quantitative results do not seem necessarily indicative of the actual viral load. Lastly, the genotypization achieved by considering the results of the two qRT-PCRs (i.e., A3 or non-A3 strains) showed a substantial agreement with sequencing results performed on bursal samples, showing the feasibility of such approach on air samples. Nonetheless, the limited amount of genetic material collected by environmental sampling may reduce the feasibility of further molecular characterization, which may be especially relevant in contexts such as Italy, where different field IBDV strains circulate.

In conclusion, air sampling represents a promising non-invasive alternative for IBDV monitoring, particularly in contexts where animal welfare or biosecurity constrain traditional sampling. However, the lower amount of captured genetic material may hamper viral quantification and exact characterization, suggesting a complementary rather than substitutive role compared with conventional methods.

INTRODUZIONE

Nel quadro delle malattie immunosoppressive del pollo, la bursite infettiva (IBD), anche nota come malattia di Gumboro, è da lungo tempo oggetto di nutrito interesse da parte degli operatori del settore avicolo per le sue gravi implicazioni sanitarie ed economiche (Van Der Berg et al., 2000). L'agente eziologico della malattia, conosciuto come virus della bursite infettiva (IBDV), appartiene alla specie *Avibirnavirus gumboroense*, genere *Avibirnavirus*, famiglia *Birnaviridae*.

Si tratta di un virus privo di *envelope* e dotato di un genoma a RNA diviso in due segmenti, denominati A e B. Per queste sue caratteristiche, IBDV è caratterizzato da un'elevata resistenza a livello ambientale e da un'intrinseca capacità di accumulare mutazioni ed andare incontro ad eventi di riassortimento, facilitando la comparsa di nuove varianti (Etteradossi et al., 2019).

Dal punto di vista patogenetico, IBDV infetta i linfociti B in fase di maturazione all'interno della borsa di Fabrizio, determinando deplezione linfocitaria e successiva immunodepressione, oltre a causare forme acute nel pollame tra le 3 e le 6 settimane di età (Sharma et al., 2000). L'adozione routinaria della profilassi vaccinale si è rivelata efficace nel contrastare l'insorgenza di IBD negli allevamenti avicoli, pur non conferendo un'immunità sterilizzante nei confronti del virus (Asfor et al., 2022). In questo contesto, la sorveglianza nei confronti di IBDV attraverso l'esecuzione di monitoraggi mirati risulta fondamentale al fine di valutare l'eventuale circolazione di ceppi IBDV di campo negli allevamenti avicoli, la comparsa di nuove varianti e l'efficacia del piano vaccinale adottato in funzione dello stato sanitario e produttivo degli animali.

I metodi molecolari rappresentano attualmente i test più utilizzati per la diagnosi e la caratterizzazione di IBDV, e la loro utilità è stata ulteriormente rafforzata dalla recente proposta di diversi sistemi di classificazione basati sulla filogenesi (Islam et al., 2021; Wang et al., 2021), che hanno consentito di descrivere nuovi tipi genetici in molte aree del mondo. Il campione di elezione è rappresentato dalla borsa di Fabrizio, l'organo linfoide che costituisce il principale sito di replicazione di IBDV. Tuttavia, il prelievo della borsa comporta necessariamente l'abbattimento degli animali, una procedura che può ostacolare le attività di monitoraggio nei contesti produttivi, dove l'attenzione al benessere animale è giustamente elevata o in aumento. Altre strategie di campionamento, come l'utilizzo di tamponi cloacali o di diverse tipologie di campioni ambientali, sono limitatamente implementate, e allo stato attuale non esiste un consenso sulla comparabilità delle loro performance rispetto a quelle garantite dal campionamento della borsa.

Nel panorama diagnostico degli ultimi anni, tecnologie non-invasive basate sul campionamento dell'aria stanno acquisendo sempre maggior rilevanza in ambito zootecnico, principalmente per la sorveglianza dei patogeni respiratori nei comparti suinicolo ed avicolo, ma anche per il monitoraggio di altri agenti patogeni di interesse per queste specie (Alonso et al., 2017; Hankel et al., 2022).

In questo contesto si inserisce il dispositivo AeroCollect®, uno strumento di campionamento dell'aria che sfrutta il principio della precipitazione elettrostatica. Il campionamento viene effettuato mediante l'applicazione di un campo elettrico ad alto voltaggio all'interno di una cartuccia monouso, consentendo la cattura e la concentrazione di virus, batteri e altre particelle presenti nell'ambiente e permettendone successivamente identificazione mediante metodiche di biologia molecolare (Aerocollect A/s, 2021).

Obiettivo di questo studio è stato pertanto quello di comparare la metodica di campionamento tradizionale per IBDV basata sul prelievo della borsa di Fabrizio con il prelievo ambientale svolto tramite tecnologia AeroCollect®, al fine di valutarne l'applicabilità e i casi d'uso all'interno del contesto produttivo italiano.

MATERIALI E METODI

Un totale di 50 gruppi di polli appartenenti a diverse filiere e categorie produttive (broiler o pollastre), immunizzati con vaccini vettorizzati o a immunocomplessi, sono stati campionati ad un'età compresa tra 27 e 44 giorni d'età (età media: 34 giorni). Le due tipologie di matrici comparate consistevano in *pool* di 4 borse di Fabrizio impresse su FTA card™ (GE Healthcare UK Limited, Amersham, UK) e campioni d'aria prelevati all'interno del rispettivo capannone utilizzando l'apposito aerocollettore. Il campionamento ambientale è stato eseguito seguendo le indicazioni del produttore (FORCE Technology, Brøndby, Denmark), ovvero camminando all'interno del capannone in esame per almeno 5 minuti ed avvicinando il più possibile lo strumento all'altezza degli animali, sollevando la lettiera al passaggio e permettendo così allo strumento di intercettare quanta più polvere possibile.

I campioni d'organo sono stati processati presso il Laboratorio di Biotecnologie e Malattie Infettive del Dipartimento MAPS dell'Università degli Studi di Padova (Legnaro, Italia), eluendo i frammenti di FTA card in 1 ml di PBS 1x e estraendo gli acidi nucleici con uno strumento QIAcube HT ed il kit QIAamp 96 Virus QIAcube HT (QIAGEN, Venlo, Paesi Bassi), mentre i campioni d'aria sono stati inviati ai laboratori Aerocollect (Brøndby, Danimarca). Per garantire la comparabilità dei risultati, entrambe le tipologie di campioni sono state sottoposte a indagini molecolari con una combinazione di due kit commerciali di RT-PCR *real-time* (qRT-PCR), Kylt® IBDV Screening e Kylt® IBDV genogroup A3 (SAN Group Biotech Germany GmbH, Hoeltinghausen, Germania), comunemente utilizzati per determinare rispettivamente la generica presenza di ceppi IBDV e l'infezione da parte di ceppi appartenenti al genogruppo A3, che rappresentano la totalità dei ceppi di campo rilevati attualmente in Italia (Poletto et al., 2026).

I risultati ottenuti sono stati comparati per valutare le performance relative delle analisi svolte sui campioni d'aria rispetto a quelle eseguite sui *pool* di borse, considerate la matrice d'elezione. Dal punto di vista qualitativo, gli esiti sono stati valutati statisticamente calcolando l'indice Kappa di Cohen (K) e tramite test di McNemar. L'associazione tra l'andamento dei valori di *cycle threshold* (Ct) ottenuti analizzando le due matrici è stata indagata considerando i soli casi di co-positività e utilizzando il test di correlazione di Spearman, mentre la presenza di differenze sistematiche tra i due metodi di campionamento è stata esaminata con il test di Wilcoxon per dati appaiati. Tutti i test statistici sono stati condotti considerando $p < 0.05$ come valore statisticamente significativo.

Per ottenere una caratterizzazione molecolare più precisa, i campioni d'organo sono stati inoltre sottoposti ad un'ulteriore analisi mediante RT-PCR *end-point*, eseguita utilizzando i primer 743-1 (5'-GCCCAGAGTCTACACCAT-3') and 743-2 (5'-CCCGGATTATGTCTT-TGA-3') (Jackwood e Sommer-Wagner, 2005) e il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen™, Waltham, MA, USA), per poi sottoporre i campioni positivi a sequenziamento Sanger presso il Macrogen Milan Genome Center (Milano, Italia) con entrambi i primer già menzionati. I cromatogrammi così ottenuti sono stati poi valutati e sottoposti a *trimming* con il software 4Peaks (Nucleobytes B.V., Aalsmeer, Paesi Bassi) per generare le sequenze per le successive analisi molecolari, che hanno previsto la comparazione con un database di sequenze di riferimento utilizzando MEGA12 (Kumar et al., 2024).

Gli esiti del sequenziamento, utilizzati per confermare la correttezza della caratterizzazione derivante dagli esiti dei due saggi di qRT-PCR, sono stati anch'essi oggetto di una comparazione qualitativa. A tale scopo, i risultati delle qRT-PCR sono stati categorizzati come segue:

- Positività a entrambe le qRT-PCR: presenza di ceppo di campo A3;
- Positività alla sola qRT-PCR generica: presenza di ceppo non-A3, presumibilmente di origine vaccinale;
- Negatività a entrambe le qRT-PCR: campione negativo.

Nel caso, non verificatosi, in cui solamente la qRT-PCR A3-specifica fosse risultata positiva, il campione sarebbe stato considerato non valido. L'indice *K* è stato quindi calcolato considerando gli esiti positivi del sequenziamento e la rispettiva caratterizzazione tramite pannello di qRT-PCR a partire dalle diverse matrici.

RISULTATI

I risultati delle analisi molecolari sono mostrati nella Tabella 1. Le indagini svolte sui campioni impressi su FTA card hanno evidenziato 47 positività alla qRT-PCR generica, con valori di Ct compresi tra 14,3 e 36,8 (media: 23,1 Ct), e 18 alla qRT-PCR A3-specifica, con

valori di Ct tra 16,6 e 35,7 (media: 24,7 Ct). Tre campioni d'organo sono risultati negativi a entrambe le metodiche.

Comparativamente, 44 campioni d'aria sono risultati positivi al saggio di real-time RT-PCR generico, con valori di Ct compresi tra 32,3 e 41,8 (media: 36,7 Ct), e 15 al test A3-specifico, con valori di Ct tra 32,8 e 39,6 (media: 37,6 Ct). Sei campioni d'aria sono risultati negativi a entrambe le metodiche.

Le analisi di RT-PCR end-point svolte sui campioni impressi su FTA card hanno evidenziato 43 positività. In base al sequenziamento, 28 di esse sono state ascritte a ceppi A1 di origine vaccinale, e 15 a ceppi del genogruppo A3 che rappresentavano due diverse tipologie ceppi di campo A3B1. In particolare, 7 di essi sono stati caratterizzati come esponenti della clade italo/russo/mediorientale (ITA/RUS/ME) e 8 come riassortanti dell'Europa nordoccidentale (NWEU).

ID	Borse di Fabrizio			Aria	
	RT-PCR + sequenziamento	qRT-PCR generica	qRT-PCR A3-specifica	qRT-PCR generica	qRT-PCR A3-specifica
1	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	17,1 Ct	22,8 Ct	32,3 Ct	32,8 Ct
2	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	14,3 Ct	22,6 Ct	37,7 Ct	37,2 Ct
3	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	21,5 Ct	Negativo	34,7 Ct	Negativo
4	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	22,2 Ct	Negativo	38,1 Ct	Negativo
5	Negativo	32,9 Ct	34,5 Ct	Negativo	Negativo
6	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	18,0 Ct	Negativo	34,0 Ct	Negativo
7	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	17,6 Ct	Negativo	37,7 Ct	Negativo
8	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	17,7 Ct	Negativo	39,0 Ct	Negativo
9	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	18,8 Ct	Negativo	39,7 Ct	Negativo
10	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	23,3 Ct	25,9 Ct	Negativo	Negativo
11	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	22,5 Ct	30,3 Ct	36,0 Ct	Negativo
12	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	30,7 Ct	29,8 Ct	36,3 Ct	38,6 Ct
13	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	22,8 Ct	Negativo	37,3 Ct	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

15	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	19,3 Ct	Negativo	35,3 Ct	Negativo
16	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	15,9 Ct	Negativo	35,3 Ct	Negativo
17	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	19,9 Ct	Negativo	36,3 Ct	Negativo
18	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	16,9 Ct	Negativo	34,0 Ct	Negativo
19	Genogruppo A1 (Faragher 52/70)	33,9 Ct	Negativo	Negativo	Negativo
20	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	18,6 Ct	19,6 Ct	33,1 Ct	37,9 Ct
21	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	25,6 Ct	20,8 Ct	34,1 Ct	38,6 Ct
22	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	21,9 Ct	Negativo	35,8 Ct	Negativo
23	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	28,6 Ct	16,6 Ct	37,4 Ct	38,8 Ct
24	Genogruppo A1 (Faragher 52/70)	31,3 Ct	Negativo	37,2 Ct	Negativo
25	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	26,3 Ct	31,5 Ct	38,6 Ct	Negativo
26	Negativo	34,2 Ct	35,7 Ct	41,8 Ct	39,6 Ct
27	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	21,5 Ct	25,1 Ct	35,7 Ct	37,6 Ct
28	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	20,1 Ct	Negativo	35,4 Ct	Negativo
29	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	28,9 Ct	22,4 Ct	35,7 Ct	37,3 Ct
30	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	21,3 Ct	20,9 Ct	38,0 Ct	39,0 Ct
31	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	16,5 Ct	Negativo	34,4 Ct	Negativo
32	Genogruppo A3 (clade ITA/RUS/ME)	23,9 Ct	21,7 Ct	38,0 Ct	36,5 Ct
33	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	18,9 Ct	Negativo	38,9 Ct	39,3 Ct
34	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	25,1 Ct	24,0 Ct	39,2 Ct	39,2 Ct

35	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	16,2 Ct	Negativo	35,7 Ct	Negativo
36	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	23,8 Ct	Negativo	35,6 Ct	Negativo
37	Negativo	32,8 Ct	Negativo	37,3 Ct	Negativo
38	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	18,0 Ct	Negativo	33,4 Ct	Negativo
39	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	22,6 Ct	Negativo	39,5 Ct	Negativo
40	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	23,8 Ct	Negativo	39,7 Ct	Negativo
41	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	17,5 Ct	Negativo	34,6 Ct	Negativo
42	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	30,1 Ct	18,1 Ct	36,1 Ct	35,6 Ct
43	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	27,7 Ct	Negativo	39,5 Ct	Negativo
44	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	23,8 Ct	Negativo	36,6 Ct	Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Genogruppo A3 (riassortanti NWEU)	20,9 Ct	22,6 Ct	35,2 Ct	35,6 Ct
47	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	24,7 Ct	Negativo	40,3 Ct	Negativo
48	Genogruppo A1 (W2512/1052-like)	19,4 Ct	Negativo	34,7 Ct	Negativo
49	Negativo	36,8 Ct	Negativo	39,5 Ct	Negativo
50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

In base alla comparazione quantitativa dei risultati ottenuti tramite qRT-PCR generica (Tabella 2), la sensibilità relativa dei campioni d'aria rispetto a quelli d'organo si è rivelata pari al 93,6% (44/47), mentre la specificità relativa era del 100% (3/3). L'accuratezza totale è stata pari al 94% (47/50), con un valore K=0,64. Il test di McNemar non ha evidenziato differenze statisticamente significative nella distribuzione dei risultati tra le due matrici (p=0,25).

Positività		Borse di Fabrizio		Totale
		Negatività		
Aria	Positività	44	0	44
	Negatività	3	3	6
Totale		47	3	50

Tabella 2. Comparazione dei risultati ottenuti tramite qRT-PCR generica nelle diverse matrici campionate.

Per quanto riguarda gli esiti della qRT-PCR A3-specifica (Tabella 3), la sensibilità e la specificità relativa dei campioni d'aria si sono dimostrate rispettivamente pari al 77,8% (14/18) e al 96,9% (31/32). L'accuratezza totale è stata pari al 90% (45/50), con un valore $K=0,77$, mentre il test di McNemar ha restituito un risultato non statisticamente significativo ($p=0,375$).

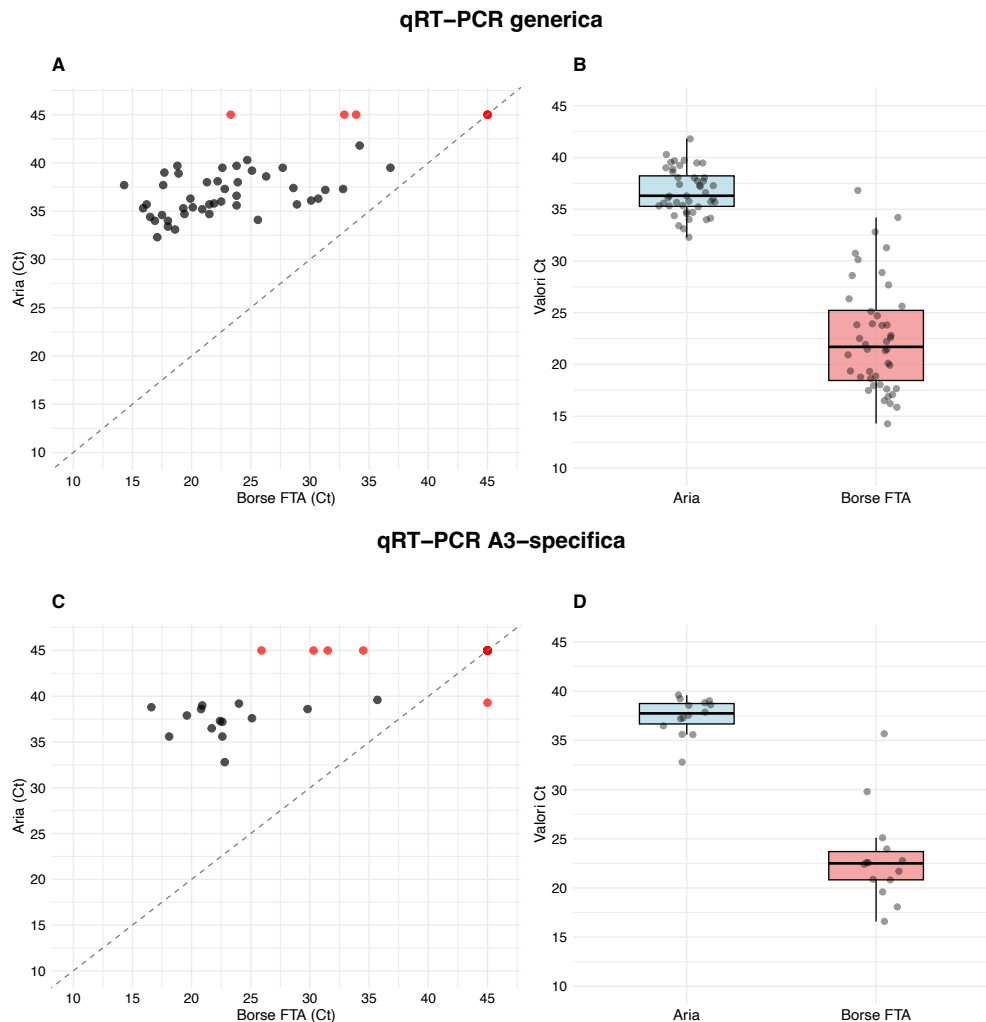
Positività		Borse di Fabrizio		Totale
		Negatività		
Aria	Positività	14	1	15
	Negatività	4	31	35
Totale		18	32	50

Tabella 3. Comparazione dei risultati ottenuti tramite qRT-PCR A3-specifica nelle diverse matrici campionate.

I risultati ottenuti analizzando le due tipologie di campioni utilizzando le metodiche di qRT-PCR sono stati valutati anche dal punto di vista quantitativo (Figura 1). L'analisi di correlazione di Spearman ha evidenziato un comportamento differente tra i due saggi diagnostici: per la qRT-PCR generica è stata riscontrata una correlazione positiva moderata ($p=0.4696$) ma altamente significativa ($p=0.0013$), indicando una chiara coerenza nell'andamento dei valori di Ct tra le diverse matrici. Al contrario, per la qRT-PCR A3-specifica, la correlazione osservata è stata debole ($p=0.1621$) e non significativa dal punto di vista statistico ($p=0.5799$), non permettendo di dimostrare un'associazione prevedibile tra i livelli di Ct delle due matrici.

Il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati ha rivelato differenze significative tra i due metodi di campionamento in entrambi i saggi diagnostici, in quanto i valori di Ct ottenuti dai campioni d'aria erano sistematicamente più elevati: per la qRT-PCR generica, il valore di Ct medio dei campioni d'aria è stato di 36,7, mentre quello rilevato dai *pool* di borse è stato di 23,1 (ΔCt medio=13,6; $p<0.0001$); per la qRT-PCR A3-specifica, il valore di Ct medio è stato pari a 24,7 nei *pool* di borse e a 37,6 campioni d'aria (ΔCt medio; $p=0.0011$).

Figura 1. Comparazione quantitativa dei risultati ottenuti mediante qRT-PCR generica e A3-specifica sulle diverse matrici prelevate, visualizzati come *scatter plot* (A, C) e *boxplot* (C, D). A fini di visualizzazione, i casi in cui almeno una matrice risultava negativa sono mostrati in rosso negli *scatter plot*, assegnando alle negatività un valore di Ct pari a 45. I *boxplot* includono solo i casi di co-positività per non alterare il calcolo dei parametri descrittivi.



La comparazione della caratterizzazione ottenuta tramite pannello di qRT-PCR coi risultati del sequenziamento ha dimostrato una sostanziale concordanza per quanto riguarda i campioni positivi: considerando sia le identificazioni di virus di campo (genogruppo A3) che quelle vaccinali (genogruppo A1), le analisi di qRT-PCR hanno prodotto un risultato concorde nel 97,7% dei *pool* di borse (42/43, $K=0,95$) e nel 90,7% considerando i rispettivi campioni d'aria (39/43, $K=0,81$) (Tabella 4).

Matrice	Risultati qRT-PCR	Risultati sequenziamento		Concordanza diagnostica
		Ceppi di campo (A3)	Ceppi vaccinali (A1)	
Borse FTA	A3	15	1	A3: 15/15, 100%
	Non A3	0	27	A1: 27/28, 96,4%
	Negativo	0	0	Totale: 42/43, 97,7%
Aria	A3	13	1	A3: 13/15, 86,7%
	Non A3	1	26	A1: 26/28, 92,9%
	Negativo	1	1	Totale: 39/43, 90,7%

Tabella 4. Concordanza diagnostica tra gli esiti del sequenziamento e della caratterizzazione tramite pannello di qRT-PCR.

DISCUSSIONE

L’analisi statistica ha permesso di confermare la sostanziale concordanza qualitativa nel rilevamento di IBDV tramite campionamento tradizionale (prelievo di borse di Fabrizio) e campionamento d’aria con aerocollettore, mentre emergono differenze significative nell’impiego delle due matrici da un punto di vista quantitativo.

Sebbene la differenza nei valori di Ct osservata tra i campioni d’aria e i *pool* di borse risulti simile per i due test di qRT-PCR, suggerendo un effettivo ruolo della modalità di campionamento, solo il saggio generico ha esibito una correlazione lineare e biologicamente coerente tra le due matrici. Il diverso comportamento del test A3-specifico potrebbe essere determinato da due fattori principali, quali il numero esiguo di casi in cui entrambe le matrici risultano positive a questo test (14 rispetto ai 44 del test generico), tale da ridurre la potenza statistica dell’analisi; ed il riscontro di valori di Ct piuttosto elevati nei campioni d’aria (compresi tra 32,8 e 39,6, media di 37,6), probabilmente prossimi al limite di rilevabilità (*limit of detection*, LoD) della metodica con conseguente perdita di linearità.

Il riscontro di valori di Ct più elevati nelle diverse qRT-PCR effettuate sui campioni d’aria rispetto alle matrici biologiche convenzionali è coerente con quanto indicato dal produttore del dispositivo, che nelle istruzioni operative per il laboratorio (Aerocollect, 2024) raccomanda di estendere il numero di cicli di amplificazione fino a 50 al fine di incrementare la sensibilità analitica partendo dal campione d’aria. Secondo queste indicazioni, l’esecuzione di qPCR con un numero standard di cicli di amplificazione (attorno ai 40) potrebbe determinare la mancata rilevazioni di campioni d’aria debolmente positivi.

Le discordanze qualitative osservate per entrambi i test, ovvero i casi in cui i campioni di borsa di Fabrizio risultano positivi e i corrispondenti campioni di aria negativi, coincidono con quei casi in cui i valori di Ct rilevati nelle borse sono relativamente elevati. Il seguente dato suggerisce per questi casi una bassa concentrazione di materiale genetico virale rilevabile nell’ambiente, e di conseguenza, una ridotta probabilità di ritrovamento mediante il campionamento dell’aria.

Il caso 10, in cui il *pool* di borse è risultato positivo con valori di Ct piuttosto bassi ad entrambe le analisi (23,3 alla generica e 25,9 alla A3-specifica) a fronte della negatività del corrispondente campione d’aria, rappresenta l’unica apparente eccezione a quest’interpretazione, la cui spiegazione più probabile è quella di una non ottimale esecuzione del campionamento ambientale.

Uno dei principali limiti della ridotta concentrazione di materiale genetico nei campioni

d'aria è rappresentato dall'impossibilità di effettuare RT-PCR *end-point* e il successivo sequenziamento su questa matrice, limitando la possibilità di caratterizzazione virale all'uso esclusivo di pannelli di qRT-PCR. Nel caso specifico di IBDV, l'informazione fornita dai kit commerciali attualmente disponibili in commercio permette di discriminare i ceppi IBDV tra ceppi classici (genogruppo A1), *very virulent* (A3) e ceppi appartenenti al genogruppo australiano A7 (Kylt, 2025). Nel contesto europeo, caratterizzato dalla predominante circolazione di ceppi riassortanti A3B1, l'impossibilità di caratterizzare il segmento genomico B e in particolare la VP1 (se non validando tecniche *in-house* nei singoli laboratori data l'assenza di kit commerciali disponibili) comporta necessariamente una limitazione della caratterizzazione genetica dei ceppi IBDV alla sola analisi del segmento A. Ne consegue che i ceppi riassortanti A3B1 vengono classificati come *very virulent* (A3B2) in base all'appartenenza al genogruppo A3, in assenza di informazioni sul segmento B.

Nonostante questo limite, i risultati della caratterizzazione di IBDV tramite il sequenziamento e in base ai risultati del pannello di qRT-PCR appaiono essenzialmente concordi in questo studio, con alcune eccezioni da menzionare:

- Caso 11: il *pool* di borse di Fabrizio è risultato positivo sia alla qRT-PCR generica che alla A3-specifica, mentre il campione d'aria solo alla qRT-PCR generica. Il sequenziamento condotto sul *pool* di borse ha evidenziato la presenza di IBDV appartenente al genogruppo A1 (W2512/1012-like). Questo risultato apparentemente discordante tra le due metodiche potrebbe essere attribuibile ad una coinfezione e alla compresenza nelle borse testate di due diverse popolazioni virali IBDV, verosimilmente rappresentate da un ceppo vaccinale ed uno di campo appartenente al genogruppo A3. In questo contesto, il virus vaccinale, presumibilmente presente a concentrazione più elevata, risulterebbe rilevabile mediante RT-PCR *end-point* e successivo sequenziamento, mentre il ceppo di campo A3, presente a concentrazione inferiore, verrebbe rilevato esclusivamente mediante qRT-PCR specifica.
- Caso 25: il *pool* di borse di Fabrizio è risultato positivo sia alla qRT-PCR generica che alla A3-specifica, mentre il campione d'aria è risultato solo positivo alla qRT-PCR generica. Il sequenziamento condotto sul *pool* di borse ha confermato la presenza di IBDV appartenente al genogruppo A3. In questo caso, considerando i bassi valori di Ct rilevati nel *pool* di borse, la mancata rilevazione del genogruppo A3 riscontrata nel campione d'aria potrebbe essere attribuita alla minore quantità di materiale genico virale intercettata con questa tipologia di campionamento.
- Caso 33: il *pool* di borse di Fabrizio è risultato positivo alla qRT-PCR generica e negativo alla A3-specifica, mentre il campione d'aria è risultato positivo ad entrambe le analisi. Il sequenziamento condotto sul *pool* di borse ha invece evidenziato la presenza di IBDV di origine vaccinale appartenente al genogruppo A1. Il seguente riscontro potrebbe trovare una spiegazione nella presenza di un ceppo di campo circolante nel gruppo e quindi riscontrato tramite il campionamento ambientale, ma non presente nelle borse di Fabrizio dei quattro animali campionati.
- In alcuni casi, la RT-PCR *end-point* effettuata sul *pool* di borse di Fabrizio è venuta negativa nonostante la positività riscontrata mediante qRT-PCR sulla stessa matrice (sia alla qRT-PCR, sia in alcuni casi anche alla A3-specifica). Tale discrepanza si può addurre alla minor sensibilità della RT-PCR *end-point* rispetto alle soluzioni *real-time* commerciali.

Approfondendo ulteriormente i risultati del sequenziamento, i ceppi vaccinali identificati in questo studio appartengono a quelli impiegati nei vaccini ad immuno-complessi (Winterfield 2512 e 1052), oltre ad un paio di ritrovamenti di Faragher 52/70, la cui VP2 è espressa in molti vaccini vettorizzati. Se da un lato i vaccini ad immuno-complessi replicano attivamente nella borsa di Fabrizio ed il loro riscontro in quest'organo è atteso, i vaccini vettorizzati HVT-IBD non presentano tropismo diretto per quest'organo ed il loro riscontro può verificarsi occasionalmente (Ramon et al., 2022; Ingraio et al., 2017). In uno di questi casi, la qRT-PCR generica per IBDV ha dato esito positivo sia da borse che da aria ed il seguente riscontro sembrerebbe confermare la possibilità di ritrovare anche i vaccini vettorizzati nell'ambiente, coerentemente con il ciclo di HVT e la sua replicazione a livello di epitelio dei follicoli delle penne (Remy et. al, 2020; Walkden-Brown et al., 2013).

Dal punto di vista epidemiologico, i risultati del seguente studio si allineano a quanto recentemente pubblicato da altri autori, individuando nei ceppi IBDV A3B1 clade ITA/RUS/ME e NWEU le due popolazioni di IBDV di campo attualmente predominanti in Italia (Poletto et al., 2026).

L'adozione di una metodica di campionamento ambientale basata sull'impiego dell'aerocollettore per il monitoraggio di IBDV sembrerebbe dunque fornire dei risultati promettenti; tuttavia è necessario declinare l'impiego del seguente strumento in funzione del contesto produttivo oggetto di indagine per comprenderne l'effettiva utilità.

Il monitoraggio ambientale trova valida applicazione nei contesti dove il benessere animale è percepito come un problema importante, piuttosto che in contesti in cui la stretta applicazione di misure di biosicurezza limita l'ingresso di personale qualificato all'interno degli allevamenti. In questi casi, l'impiego di Aerocollect® si rivela assai utile, grazie anche alla semplicità di impiego dello strumento che non necessita di competenze specifiche.

Ulteriori vantaggi di questa metodica di campionamento, oltre al rispetto del benessere animale e la praticità di esecuzione del monitoraggio già citati, includono la possibilità di poter sottoporre il medesimo campione d'aria a diverse indagini biomolecolari *real-time*, includendo anche altri patogeni di interesse avicolo oltre ad IBDV. Questo consente di indagare lo status sanitario degli animali impiegando un'unica matrice per tutte le analisi. Da un punto di vista strettamente laboratoristico, inoltre, il campione d'aria non necessita di alcuna estrazione e la sola eluizione del campione è sufficiente per effettuare analisi di biologia molecolare, riducendo tempi e costi di analisi.

Questa tecnologia presenta però dei limiti evidenti in termine di caratterizzazione virale e potrebbe dunque trovare la sua applicazione ottimale in quei contesti dove il riscontro di una semplice positività a IBDV fornisce già un'esauriente risposta a livello diagnostico. Un esempio significativo è rappresentato dalla Danimarca, paese dove la vaccinazione nei confronti della malattia di Gumboro non è routinaria ed è adottata solo in particolari condizioni, principalmente mediante la somministrazione di vaccini vivi attenuati in acqua di bevanda, piuttosto che di vaccini vettorizzati HVT-IBD in incubatoio (Olesen et al., 2018). In questo contesto, caratterizzato da bassa pressione infettiva e da una situazione epidemiologica omogenea, la semplice distinzione "positivo/negativo" per IBDV risulta efficace sia ai fini del monitoraggio della vaccinazione che nel riscontro di eventuali ceppi non vaccinali.

Al contrario, nel panorama italiano e di altri paesi europei dove i ceppi riassortanti A3B1 rappresentano la popolazione IBDV di campo prevalente (Legnardi et al., 2023) e la vaccinazione nei confronti della malattia di Gumboro è routinaria, affidarsi esclusivamente alla caratterizzazione del segmento A può fornire un'informazione incompleta e fuorviante se non adeguatamente contestualizzata.

CONCLUSIONI

La comparazione tra il campionamento tradizionale ed il campionamento dell'aria tramite aerocollettore ha evidenziato risultati promettenti nel rilevamento di IBDV negli allevamenti avicoli italiani. Nonostante l'evidente necessità di aumentare la numerosità campionaria per una valutazione più robusta anche a livello statistico, i risultati preliminari suggeriscono un possibile utilizzo complementare del monitoraggio dell'aria piuttosto che sostitutivo dei metodi convenzionali per il monitoraggio di IBDV.

I limiti riscontrati in termini di sensibilità analitica e di capacità di caratterizzazione virale tramite campionamento dell'aria possono infatti determinare errori diagnostici e un'inappropriata identificazione dei ceppi virali circolanti, soprattutto in contesti quali quello italiano, dove la circolazione di ceppi IBDV riassortanti A3B1 è ampiamente documentata.

BIBLIOGRAFIA

1. AeroCollect A/S. (2023). *AeroCollect® brochure*. Brøndby, Denmark: AeroCollect A/S.
2. Aerocollect A/S (2024). *Analysis of AeroCollect® air samples – a laboratory procedure guide* (Version 4.0). (2024, April 8).
3. Alonso C, Raynor PC, Goyal S, Olson BA, Alba A, Davies PR, Torremorell M. (2017) Assessment of air sampling methods and size distribution of virus-laden aerosols in outbreaks in swine and poultry farms. *J Vet Diagn Invest*. 2017 May;29(3):298-304.
4. Asfor, A. S., Reddy, V. R., Nazki, S., Urbaniec, J., Brodrick, A. J., & Broadbent, A. J. (2022). Modeling infectious bursal disease virus (IBDV) antigenic drift in vitro. *Viruses*, 15(1), 130.
5. Etteradossi, N., and Saif, Y. M. (2019). Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (Eds.), *Diseases of Poultry*, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, pp. 257–283.
6. Hankel J, Gibson T, Skov J, Andersen KB, Dargatz M, Kappel A, Thiemann F, Curtis B, Chuppava B, Visscher C. (2022) Monitoring of *Campylobacter jejuni* in a chicken infection model by measuring specific volatile organic compounds and by qPCR. *Sci Rep*. 2022 Jul 11;12(1):11725.
7. Fiona Ingraio, Fabienne Rauw, Thierry van den Berg & Bénédicte Lambrecht (2017) Characterization of two recombinant HVT-IBD vaccines by VP2 insert detection and cell mediated immunity after vaccination of specific pathogen-free chickens, *Avian Pathology*, 46:3, 289-299
8. Islam, M. R., Nooruzzaman, M., Rahman, T., Mumu, T. T., Rahman, M. M., Chowdhury, E. H., Etteradossi, N., and Müller, H. (2021). A Unified Genotypic Classification of Infectious Bursal Disease Virus Based on Both Genome Segments. *Avian Pathology*, 50(2), 190–206.
9. Jackwood, D. J., and Sommer-Wagner, S. E. (2005). Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emerging Viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49(2), 220–226.
10. Kylv® (AniCon Labor GmbH), (2025). PRO FLY Kylv® IBDV Flyer, version V3. Senftenberg (Germany)
11. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., and Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263.
12. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Koutoulis K, Cecchinato M. (2023). Infectious bursal disease virus in Western Europe: the rise of reassortant strains as the dominant field threat. *Avian Pathology*, Feb;52(1):25-35
13. Olesen L, Dijkman R, Koopman R, van Leeuwen R, Gardin Y, Dwars RM, de Bruijn

- ND, Boelm GJ, Elattrache J, de Wit JJ. Field and laboratory findings following the large-scale use of intermediate type infectious bursal disease vaccines in Denmark. *Avian Pathology*. 2018 Dec;47(6):595-606.
14. Poletto, F., Lizzi, G., Legnardi, M., Lupini, C., Tucciarone, C. M., Franzo, G., ... & Cecchinato, M. (2026). Molecular epidemiology of IBDV in Italy: emergence of North-western European reassortants (genotype A3B1) and co-circulation with local strains. *Avian Pathology*, 55(1), 103–110.
 15. Ramon, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Cazaban, C., Tucciarone, C. M., Fiorentini, L., ... & Franzo, G. (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. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 978901.
 16. Rémy S, Le Pape G, Gourichon D, Gardin Y, Denesvre C. (2020). Chickens can durably clear herpesvirus vaccine infection in feathers while still carrying vaccine-induced antibodies. *Veterinary Research*, Feb 24;51(1):24.
 17. Sharma, J.M., Kim, I.J., Rautenschlein, S. & Yeh, H.Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology*, 24, 223–235.
 18. Van den Berg, T. P., Etteradossi, N., Toquin, D., Meulemans, G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Chapter 3.3.12.
 19. Walkden-Brown, Stephen W., et al. (2013). Development, Application, and Results of Routine Monitoring of Marek's Disease Virus in Broiler House Dust Using Real-Time Quantitative PCR. *Avian Diseases*, vol. 57, no. 2, 2013, pp. 544–54
 20. Wang, Y. L., Fan, L. J., Jiang, N., Gao, L., Li, K., Gao, Y. L., Liu, C. J., Cui, H. Y., Pan, Q., Zhang, Y. P., Wang, X. M., and Qi, X. (2021). An Improved Scheme for Infectious Bursal Disease Virus Genotype Classification Based on Both Genome-Segments A and B. *Journal of Integrative Agriculture*, 20, 1372–1381.

MONITORAGGIO MOLECOLARE E SIEROLOGICO DELLA CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN POLLASTRE E GALLINE OVAIOLE IN ITALIA

Tucciarone C.M.¹, Pasotto D.¹, Baston R.¹, Andolfatto C.¹, Poletto F.¹, Harper V.², Fiorini L.³, Franzo G.¹, Legnardi M.¹, Cecchinato M.¹

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

² *Veterinario avicolo, Italia;*

³ *Tecnico avicolo, Italia.*

Summary

The epidemiology of avian metapneumovirus (aMPV) in the egg production sector has been scarcely investigated so far. This survey aimed at evaluating aMPV circulation in pullet and layer farms of an Italian egg-producing company. Although no specific clinical signs were reported, aMPV subtype B field strains were detected in less than 10% of the samples in various farms, predominantly in layers. Indirect ELISA screening for aMPV revealed high seroprevalence in both pullets and layers, indicating extensive aMPV circulation in the egg production sector. However, the lack of clinical signs hampers the direct identification of the pathogen. This scenario is in line with the high infectious pressure previously reported in broilers in Italy, confirming the possible role of long-lived birds as aMPV reservoirs in densely populated poultry areas.

INTRODUZIONE

I dati sull'epidemiologia del metapneumovirus aviare (aMPV) nelle pollastre e nelle galline ovaiole in Italia sono ancora scarsi. aMPV è un virus a singolo filamento di RNA, appartenente alla famiglia *Pneumoviridae*, genere *Metapneumovirus* che è stato identificato per la prima volta in Sudafrica negli anni '70 come agente eziologico della rinotracheite del tacchino (*Turkey Rhinotracheitis*, TRT). aMPV è oggi riconosciuto come uno dei più comuni patogeni respiratori anche del pollo, con rilevante impatto economico sull'industria avicola mondiale [1].

Recentemente, aMPV ha acquisito notevole importanza anche per la comparsa dei sottotipi A e B in Nord America, fino a quel momento esente dalla loro circolazione, con conseguenze cliniche e produttive importanti [2-3].

Dal punto di vista clinico, l'infezione da aMPV nei tacchini si manifesta con sintomatologia respiratoria, caratterizzata da scolo nasale, sinusite infraorbitale, congiuntivite e, nei casi più gravi complicati da sovrainfezioni batteriche e da condizioni di allevamento non ottimali, può verificarsi mortalità elevata [4]. Nel pollo da carne, aMPV è associato alla sindrome della testa gonfia (*Swollen Head Syndrome*, SHS), mentre nelle ovaiole e nei riproduttori la forma respiratoria può essere meno evidente ma si possono manifestare cali produttivi significativi e alterazione della qualità delle uova [4].

In Italia, erano inizialmente presenti entrambi i sottotipi principali (A e B), ma negli ultimi anni è stata riportata la circolazione del solo sottotipo B [1]. Studi di sieroprevalenza nel broiler hanno confermato una grande diffusione di aMPV e la circolazione del patogeno in cicli successivi nella stessa azienda [5]. L'impiego della vaccinazione nel controllo dell'infezione non è uniforme; vaccini vivi attenuati vengono storicamente impiegati nel tacchino da carne e combinati con vaccini inattivati nei riproduttori e nelle ovaiole, mentre comincia ad essere adottata anche nel pollo da carne la vaccinazione con vaccini vivi attenuati [1].

Questo studio ha avuto l'obiettivo di valutare la circolazione di aMPV in allevamenti di pollastre e ovaiole appartenenti a un'azienda italiana produttrice di uova.

MATERIALI E METODI

Sono state coinvolte nello studio varie aziende di una grande filiera italiana di produzione di uova. Sono stati raccolti 15 tamponi tracheali e orofaringei e 15 sieri per gruppo di animali, sia da aziende di pollastre sia da aziende di ovaiole.

I tamponi sono stati analizzati in pool, processati per l'estrazione degli acidi nucleici con il kit QIAamp 96 Virus QIAcube HT Kit (Qiagen, Hilden, Germania) con lo strumento QIAcube HT (Qiagen, Hilden, Germania) e analizzato con una metodica RT-PCR mirata all'amplificazione di un tratto parziale del gene G [6] con il kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen™, Waltham, USA) sullo strumento SimpliAmp™ (Applied Biosystems™, Waltham, USA). Gli amplificati sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger presso la ditta Macrogen (Milano, Italia) con gli stessi primer usati per l'amplificazione. Le sequenze sono state analizzate per la ricostruzione di un albero filogenetico con il software MEGA X [7].

I campioni di sangue sono stati sottoposti a centrifugazione per la separazione del siero, che è stato analizzato individualmente per la valutazione degli anticorpi totali per aMPV con il kit ART ELISA (Biochek, Reeuwijk, Paesi Bassi).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono state campionate 54 aziende, di cui 22 aziende di pollastre e 32 aziende di ovaiole, per un totale di 161 pool di tamponi orofaringei o tracheali raccolti nei due anni 2024-2025. Sebbene non siano stati segnalati segni clinici specifici, in 7 allevamenti su 54 (13%) e nel 9,3% dei campioni (15/161) sono stati identificati dei ceppi di campo di aMPV, classificati tutti come sottotipo B e appartenenti ad un cluster di sequenze italiane.

Lo screening ELISA per aMPV ha rivelato uno scenario diverso: sono stati campionati 91 gruppi e solo 4 gruppi sono risultati negativi, mentre il restante 95,6% dei gruppi di animali ha dimostrato titoli anticorpali elevati.

I risultati evidenziano una circolazione particolarmente diffusa di aMPV, riscontrata sia nelle pollastre che nelle ovaiole. I titoli anticorpali hanno tuttavia mostrato una marcata eterogeneità, indicativa di una condizione immunitaria disomogenea all'interno dei gruppi. Tale variabilità suggerisce che l'esposizione al virus in fase di pollastra non costituisca di per sé una garanzia di protezione nelle successive fasi produttive, anche in considerazione della composizione eterogenea dei gruppi in deposizione, spesso formati unendo animali di diversa provenienza. L'assenza di segni clinici complica inoltre l'identificazione delle finestre di campionamento ottimali per la rilevazione diretta di questo patogeno, ma l'elevata sieroprevalenza rivela uno scenario in linea con l'elevata pressione infettiva osservata nel Nord e Centro Italia e precedentemente riportata anche nei broiler.

CONCLUSIONI

Questo studio conferma che gli animali a lunga vita possono fungere da importanti serbatoi per la persistenza e la circolazione di aMPV nelle aree ad elevata densità di aziende. Per quanto spesso nei gruppi non siano evidenti segni clinici, l'impatto della presenza di aMPV in fase di deposizione dovrebbe essere indagato sulla base dei dati produttivi del singolo gruppo, non sempre facilmente ottenibili. Di conseguenza, dovrebbe essere valutata anche la possibile utilità della vaccinazione nell'uniformare la risposta immunitaria dei gruppi, soprattutto nell'ottica della protezione in fase di ovodeposizione.

BIBLIOGRAFIA

1. Baston, R., Tucciarone, C. M., Franzo, G., Legnardi, M., and Cecchinato, M. (2025). A History of Neglect: Avian Metapneumovirus (aMPV) Epidemiology in Europe, the Middle East, and North Africa. *Avian Diseases*, 69 (S1): 483-495.
2. Goraichuk, I. V., Torchetti, M. K., Killian, M. L., Kapczynski, D. R., Sary, K., Kulkarni, A., and Suarez, D. L. (2024). Introduction of avian metapneumovirus subtype A to the United States: molecular insights and implications. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1428248.
3. Luqman, M., Duhan, N., Temeeyasen, G., Selim, M., Jangra, S., and Mor, S. K. (2024). Geographical expansion of avian metapneumovirus subtype B: first detection and molecular characterization of avian metapneumovirus subtype B in US poultry. *Viruses*, 16(4): 508.
4. Clontz, D. M., and Hoerr, F. J. (2025). Avian Metapneumovirus: A Review of Pathogenesis and Its Effect on Diagnosis. *Avian Diseases*, 69(S1): 505-515.
5. Tucciarone, C. M., Legnardi, M., Cecchinato, M., Franzo, G., Poletto, F., Miccio, L., ... and Pasotto, D. (2024). Research note: indirect evidence of avian metapneumovirus circulation in broilers in Italy. *Poultry Science*, 103(11): 104182.
6. Cecchinato, M., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Clubbe, J., Battilani, M., and Naylor, C. J. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary microbiology*, 146 (1-2): 24-34.
7. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547-1549.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEGLI AGENTI VIRALI IMMUNODEPRESSIVI E DELLE LESIONI ASSOCIATE RILEVATE MEDIANTE MONITORAGGIO LONGITUDINALE IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE

Zambon I.¹, Zanardello C.¹, Giacomelli M.², Foiani G.¹, Dall'Angelo A.³, Broggi M.⁴, Galbusera F.⁵, Pirotta M.⁶, Drago A.¹, Leardini S.¹, Perina A.², Benini V.², Varelli M.P.², Fusaro A.¹, Bortolami A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Sede centrale - Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Sezione Territoriale di Verona - Via Bovolino, 1, 37060 Buttapietra (VR)

³Cooperativa Agricola San Martino, via Sommacampagna 63/H, 37135 Verona

⁴Veterinario avicolo, 40128 Bologna

⁵Tecnico di allevamento avicolo, 23900 Lecco

⁶Veterinario avicolo, 22100 Como

Summary

Immunosuppressive viral infections remain a major challenge for broiler production because of their impact on immune competence, vaccine responsiveness and overall flock health. Within a longitudinal monitoring programme carried out in two commercial broiler farms in north-eastern Italy, the circulation and pathological relevance of infectious bursal disease virus (IBDV), avian reovirus (ARV) and chicken infectious anaemia virus (CIAV) were investigated by integrating molecular detection, genetic characterization and histopathological analyses.

Histopathological examination of collected tissues revealed recurrent lymphoid lesions, mainly affecting the bursa of Fabricius, including follicular lymphoid depletion, interstitial thickening and bursal atrophy of variable severity, particularly in older birds. IBDV was the most frequently detected pathogen and phylogenetic analysis identified the frequent circulation of very virulent IBDV strains belonging to genotype A3B1, occasionally co-detected with classical/vaccine-related strains. The detection of A3B1 field strains in vaccinated birds, mainly from 28–35 days of age, indicates that the vaccination protocols applied did not fully prevent infection or replication of field viruses, although they have contributed to the absence of overt clinical disease. ARV strains were detected in both farms and showed marked genetic heterogeneity, clustering within different σ C genotypic groups across farms, production cycles and sampling ages. CIAV was detected sporadically, only in one farm and mainly at the end of the production cycle, but its detection in multiple cycles and association with thymic and lymphoid changes deserve further investigation on the frequency of introduction of this pathogen in the broiler sector and its significance.

Overall, these findings highlight the pathological relevance of subclinical immunosuppressive viral infections in broilers and confirm the value of combining longitudinal monitoring, molecular epidemiology, phylogenetic analysis and histopathology to distinguish incidental viral detection from biologically meaningful tissue damage under field conditions.

INTRODUZIONE

L'efficacia della risposta immunitaria è il risultato dell'interazione tra fattori intrinseci dell'ospite e fattori ambientali, tra i quali assumono particolare rilevanza gli agenti infettivi in grado di indurre immunosoppressione. Nel settore avicolo, diversi virus, tra cui il virus della bursite

infettiva (IBDV), il virus dell'anemia infettiva del pollo (CIAV), il virus della malattia di Marek (MDV) e i reovirus aviari (ARV), sono riconosciuti per la loro capacità di compromettere l'efficienza del sistema immunitario attraverso la replicazione nei tessuti linfoidei e l'induzione di apoptosi cellulare, con conseguente linfopenia persistente anche dopo la clearance virale (Balamurugan & Kataria, 2006; Schat & Skinner, 2022).

Il presente studio si inserisce in un progetto di monitoraggio longitudinale volto a valutare l'impatto degli agenti virali immunosoppressivi in allevamenti di polli da carne localizzati nell'area ad elevata densità avicola (DPPA) del Veneto. L'attività di ricerca ha consentito l'identificazione ripetuta di virus immunosoppressivi in diversi cicli produttivi, fornendo la base per la caratterizzazione genetica dei ceppi circolanti. Parallelamente, le indagini istologiche condotte su campioni di organi bersaglio hanno evidenziato alterazioni istopatologiche correlabili alla presenza degli agenti virali.

Nel complesso, i risultati preliminari documentano una circolazione stabile e ricorrente di virus immunosoppressivi negli allevamenti monitorati e ne definiscono il profilo genetico, associata a evidenze istopatologiche compatibili con immunodepressione sistemica anche in assenza di lesioni macroscopiche evidenti. Questi riscontri sottolineano il ruolo spesso subclinico ma immunologicamente rilevante di tali agenti, con potenziale impatto sulle performance produttive dei broiler. Le evidenze ottenute rafforzano pertanto la necessità di strategie integrate di sorveglianza, controllo e prevenzione per mitigarne gli effetti a livello di allevamento.

MATERIALI E METODI

A partire da agosto 2025 sono stati monitorati due allevamenti di polli da carne ("Allevamento 1" e "Allevamento 2") localizzati in provincia di Verona, seguendo cicli produttivi consecutivi. In ciascun ciclo sono state campionate 5 carcasse a 14, 21, 28, 35 e 42 giorni di età. Durante l'esame necroscopico sono stati prelevati i campioni destinati alle diverse analisi.

Per le indagini virologiche sono stati raccolti tessuti appartenenti al sistema linfoide (timo, milza e borsa di Fabrizio), campioni intestinali (ansa duodenale e tratto intestinale a monte del diverticolo di Meckel) e, in presenza di lesioni compatibili con ARV, campioni di tendine del gastrocnemio.

Le analisi virologiche sono state eseguite mediante metodiche molecolari standardizzate per la rilevazione dei principali virus immunosoppressivi avicoli. In particolare la ricerca di IBDV è eseguita da borsa di Fabrizio e milza mediante one-step real-time RT-PCR (rRT-PCR) su RNA, con target in regione del gene VP4, adottando un formato multiplex con doppia sonda per identificare distintamente virus "classical" e "very virulent": sonda VIC (IBDV-Classical) e sonda FAM (IBDV-Very Virulent). I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a caratterizzazione genetica mediante sequenziamento Sanger. Per il virus della bursite infettiva sono state analizzate le regioni ipervariabili dei geni VP2 e VP1 (Islam et al., 2021), mentre per il reovirus aviare è stata sequenziata una porzione del gene σ C (Kovács et al., 2023). Per l'anemia infettiva aviare la caratterizzazione genetica e l'analisi filogenetica sono state effettuate sul gene VP1, secondo quanto riportato in letteratura (Quaglia et al., 2021).

Le sequenze ottenute sono state utilizzate per l'inferenza filogenetica e l'assegnazione dei cladi sulla base di confronti con sequenze di riferimento. Le analisi filogenetiche sono state condotte mediante MEGA e IQ-TREE per allineamento e ricostruzione degli alberi. La visualizzazione ed annotazione degli alberi sono state effettuate tramite iTOL.

Per le indagini istopatologiche sono stati analizzati i principali organi target, includendo i medesimi tessuti linfoidei, con estensione a nervo ischiatico (a 42 giorni) e a intestino, articolazioni e tendini in presenza di lesioni macroscopiche, indipendentemente dall'età degli animali. I campioni, fissati in formalina tamponata al 10% per 72 ore, sono stati processati secondo protocolli standard e inclusi in paraffina. Le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina (EE) ed

esaminate mediante microscopia ottica. Sono state valutate alterazioni nei principali organi bersaglio (timo, milza, borsa di Fabrizio, midollo osseo femorale, nervo ischiatico e intestino), includendo deplezione linfocitaria, fenomeni infiammatori, alterazioni vascolari e modificazioni strutturali. Per la borsa di Fabrizio è stato applicato uno score istopatologico da 0 a 5, basato su un sistema di grading adattato da Bharathi et al. (2021) riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Sistema di grading istopatologico utilizzato per classificare le lesioni a carico della borsa di Fabrizio.

Score	Descrizione
0	Assenza di lesioni istopatologiche
1	Lieve e diffusa deplezione linfocitaria follicolare, sporadica presenza di necrosi midollare
2	Moderata/grave deplezione linfocitaria follicolare, con ispessimento lieve interstiziale e multifocale necrosi midollare
3	Moderata/grave deplezione linfocitaria follicolare, con ispessimento interstiziale e presenza di cavità cistiche con/senza detriti cellulari a sede follicolare
4	Invaginamento della mucosa di rivestimento con parziale sostituzione dei follicoli da parte della stessa, formazione di cavità cistiche nella mucosa, ispessimento interstiziale
5	Alterazione completa della normale architettura dell’organo con invaginamento della mucosa di rivestimento e sostituzione dei follicoli da parte della stessa, formazione di cavità cistiche nella mucosa, ispessimento interstiziale

RISULTATI

Ad oggi sono disponibili i dati relativi a tre cicli produttivi consecutivi per ciascuno dei due allevamenti monitorati. L’esame istopatologico ha evidenziato un coinvolgimento prevalente della borsa di Fabrizio, con lesioni caratterizzate da deplezione linfocitaria follicolare, vacuolizzazione, ispessimento dell’interstizio e atrofia bursale di gravità variabile. Le alterazioni moderate-severe (score istologico ≥ 3) sono state osservate nei soggetti campionati a 35 e 42 giorni di età (Tabella 2).

Tabella 2. Distribuzione dei soggetti con punteggio istologico bursale ≥ 3 per età, allevamento e ciclo produttivo.

	Allevamento 1			Allevamento 2		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
14gg						
21gg						
28gg	20%	20%	60%			40%
35gg	100%	80%	60%			
42gg	80%	40%		40%		

Timo e midollo osseo hanno mostrato alterazioni sporadiche e generalmente di lieve entità, mentre la milza presentava frequentemente fenomeni congestizi. A livello intestinale è stata osservata prevalentemente enterite catarrale in tutti i cicli produttivi monitorati dei due allevamenti. Inoltre in un ciclo produttivo dell'Allevamento 1 e in due cicli produttivi dell'Allevamento 2 sono stati rilevati reperti compatibili con tendinite, sinovite e tenosinovite cronico-attiva. Nessuna alterazione significativa è stata osservata a livello del nervo ischiatico. IBDV è risultato il patogeno più frequentemente rilevato. Tra i 18 campioni caratterizzati, l'analisi filogenetica della regione ipervariabile di VP2 ha evidenziato la circolazione di ceppi appartenenti al lineaggio A3 (vvIBDV) e ceppi A1 di tipo classical/vaccinale, mentre le sequenze di VP1 risultavano tutte riconducibili a ceppi B1 classical-like (Tabella 2).

Tabella 3. Positività rilevate per IBDV ed indicazione del genotipo identificato nei campioni positivi mediante sequenziamento ed analisi filogenetica. NR: Non rilevato

	Allevamento 1			Allevamento 2		
	<i>Ciclo 1</i>	<i>Ciclo 2</i>	<i>Ciclo 3</i>	<i>Ciclo 1</i>	<i>Ciclo 2</i>	<i>Ciclo 3</i>
14gg	NR	NR	NR	NR	NR	NR
21gg	NR	NR	NR	NR	NR	NR
28gg	A3B1	A1aB1	NR	NR	NR	A1bB1
35gg	A3B1	Co-infezione A3-A1aB1	A1aB1	A3B1	A1bB1	A1bB1
42gg	A3B1	A3B1	NR	A3B1	NR	NR

L'analisi filogenetica di ARV, condotta su 13 campioni (10 provenienti da intestino e 3 da tendine), ha mostrato una marcata eterogeneità genetica, con ceppi distribuiti nei principali cluster descritti in letteratura. La distribuzione dei cluster variava tra allevamenti e cicli consecutivi, indicando la contemporanea circolazione di popolazioni virali geneticamente distinte (Tabella 2). I campioni provenienti da tendine risultavano frequentemente associati ai quadri infiammatori muscoloscheletrici osservati all'esame istologico, in particolare sinovite e tenosinovite.

Tabella 4. Distribuzione dei cluster genotipici di ARV (gene σ C) identificati nei campioni positivi, per età, allevamento e ciclo produttivo. NR: Non rilevato. Tra parentesi la matrice di provenienza dei campioni (I: Intestino, T: tendine).

	Allevamento 1			Allevamento 2		
	<i>Ciclo 1</i>	<i>Ciclo 2</i>	<i>Ciclo 3</i>	<i>Ciclo 1</i>	<i>Ciclo 2</i>	<i>Ciclo 3</i>
14gg	Cluster 3 (I)	NR	NR	NR	NR	Cluster 4 (I)
21gg	NR	Cluster 1 (I)	Cluster 1 (I)	Cluster 2 (I)	NR	Cluster 4 (I)
28gg	NR	NR	Cluster 1 (T)	NR	Cluster 1 (I)	NR
35gg	Cluster 2 (I)	NR	Cluster 1 (T)	Cluster 2 (I)	Cluster 1 (T)	NR
42gg	NR	NR	NR	NR	NR	NR

CIAV è stato rilevato sporadicamente, esclusivamente nell'Allevamento 1, soprattutto nei campionamenti di fine ciclo. Sebbene la positività molecolare sia risultata limitata, nei soggetti positivi sono state osservate occasionali alterazioni timiche e fenomeni di deplezione linfoide compatibili con un possibile coinvolgimento del virus nel quadro immunodepressivo.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti documentano la circolazione concomitante di più virus immunodepressivi negli allevamenti commerciali di broiler oggetto del monitoraggio. Tra questi, IBDV è risultato il patogeno rilevato con maggiore frequenza. La caratterizzazione genetica ha evidenziato la presenza di ceppi di campo appartenenti al lineaggio A3B1 associato alla variante very virulent e già descritto come genotipo dominante nel territorio italiano (Poletto et al., 2026). La contestuale identificazione di ceppi di origine vaccinale (genotipi A1a-A1b/B1), osservata in particolare nell'Allevamento 1, riflette le pratiche vaccinali adottate nell'allevamento in oggetto e indica che la vaccinazione non ha impedito l'infezione o la replicazione di ceppi di campo very virulent, pur in assenza di una sintomatologia clinica manifesta o di un aumento marcato della mortalità. IBDV non è stato rilevato nei campionamenti precoci a 14 e 21 giorni, mentre le positività compaiono a partire da 28 giorni e risultano più frequenti a 35 giorni, con ulteriore persistenza di ceppi A3B1 di campo in alcuni cicli fino a 42 giorni. Questo andamento è compatibile con una finestra di suscettibilità che si apre nella seconda metà del ciclo produttivo, quando la protezione conferita dagli anticorpi materni e/o dalla vaccinazione può non essere sufficiente a prevenire l'infezione di campo, ma può comunque contribuire a modulare il fenotipo clinico, limitando la comparsa della forma classica ad elevata mortalità. L'associazione tra positività per ceppi vvIBDV e lesioni a carico della Borsa di Fabrizio risulta fortemente supportata dai dati ottenuti: su 10 casi con punteggio istologico bursale ≥ 3 , la presenza di ceppi di campo è stata confermata mediante diagnostica molecolare in 9 casi. È stata inoltre rilevata un'unica discordanza in cui la lesione moderata/severa non risultava associata ad alcuna positività molecolare, e un caso isolato in cui l'identificazione molecolare di un ceppo di campo non si accompagnava a un punteggio istologico ≥ 3 . Tale danno, coinvolgendo prevalentemente i linfociti B, depone per un possibile coinvolgimento della componente immunitaria umorale e conferma un ruolo patogenetico dei ceppi A3B1 di IBDV anche in assenza di sintomatologia clinica manifesta. Pur essendo noto che, in popolazioni vaccinate, un'infezione da vvIBDV non debba necessariamente manifestarsi con il fenotipo clinico "classico" ad alta mortalità, i dati ottenuti dimostrano che tale occorrenza non è priva di conseguenze sulla competenza immunitaria dell'ospite (Schat & Skinner, 2022).

Anche ARV ha mostrato una circolazione diffusa in entrambi gli allevamenti, con una marcata eterogeneità genetica evidenziata dalla rilevazione di virus appartenenti ai diversi cluster descritti in letteratura. La rilevazione del virus è avvenuta a diverse età degli animali senza chiare concentrazioni in una determinata fase del ciclo produttivo. Anche all'interno dello stesso ciclo produttivo sono stati rilevati virus distinti dal punto di vista genetico suggerendo più eventi introduttivi o la contemporanea circolazione di più ceppi virali. Nei due allevamenti, ARV è stato isolato e caratterizzato geneticamente principalmente da campioni intestinali. A livello extraintestinale, il virus è stato invece isolato esclusivamente da campioni articolari prelevati da soggetti clinicamente affetti in tre distinti momenti di campionamento, in ulteriori due casi non è stato possibile caratterizzare il virus identificato alle metodiche molecolari di screening. La caratterizzazione dei ceppi identificati a livello articolare ha evidenziato che tutti i campioni provenienti da tendine ricadono all'interno del Cluster 1, suggerendo un'associazione tra questo genotipo e lo sviluppo di quadri di tenosinovite di natura virale. Coerentemente, tali campioni risultavano frequentemente associati ai quadri infiammatori muscoloscheletrici osservati all'esame istologico, in particolare sinovite e tenosinovite.

Maggiore diversità genetica è stata osservata nei campioni isolati a livello enterico e risulta difficile interpretarne il ruolo nelle forme di enterite catarrale riscontrate nella maggior parte dei soggetti analizzati. Risulta interessante la rilevazione del virus anche a sole due settimane di età suggerendo un'esposizione precoce all'interno del ciclo produttivo. Questo, associato alla frequenza di rilevazione ed alla diversità genetica riscontrata indica un'elevata pressione infettiva ed una situazione epidemiologica complessa per quanto riguarda ARV. In questo scenario, la contemporanea presenza di altri virus immunosoppressivi, come IBDV potrebbe favorire la persistenza e l'amplificazione di ARV o facilitarne la diffusione extra-intestinale. CIAV è stato rilevato solo sporadicamente ed esclusivamente nell'Allevamento 1, soprattutto nei campionamenti di fine ciclo. Trattandosi di un agente immunodepressivo che colpisce principalmente i precursori ematopoietici e il timo, con effetti generalmente più marcati nei soggetti giovani, le infezioni da CIAV acquisite in fasi più tardive del ciclo produttivo tendono verosimilmente a decorrere in forma subclinica o paucisintomatica. Pur rappresentando un riscontro meno frequente rispetto a IBDV e ARV nei cicli monitorati, la rilevazione del virus in più cicli produttivi mantiene comunque un interesse epidemiologico, in particolare ai fini dell'identificazione delle possibili vie di introduzione e persistenza dell'infezione in allevamento. La presenza, nei soggetti positivi, di alterazioni timiche e fenomeni di deplezione linfoide in assenza di sintomatologia clinica riferibile a CIAV evidenzia il possibile contributo del virus a fenomeni immunodepressivi anche in seguito ad introduzioni tardive all'interno dell'allevamento.

CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia la circolazione ricorrente di IBDV e ARV, e più sporadicamente di CIAV, in allevamenti commerciali di broiler localizzati in un'area ad elevata densità avicola del Veneto. In particolare, il riscontro diffuso di ceppi A3B1 di campo, associati alla variante very virulent di IBDV, in animali vaccinati e prevalentemente a partire dalla quarta settimana di vita, indica che i protocolli vaccinali adottati non hanno impedito completamente l'infezione o la replicazione di ceppi di campo. Tuttavia, l'assenza di una sintomatologia clinica manifesta o di un aumento marcato della mortalità suggerisce che la vaccinazione possa aver contribuito a modulare l'espressione clinica dell'infezione. La presenza di lesioni anche severe a carico del tessuto linfoide bursale in animali vaccinati merita ulteriori approfondimenti, in particolare per definire il reale impatto della circolazione di questo genotipo nei broiler allevati nell'area considerata. La deplezione linfocitaria associata alle lesioni della borsa di Fabrizio, coinvolgendo prevalentemente il comparto B-cellulare, può infatti compromettere l'efficienza della risposta umorale, con possibili ripercussioni sull'efficacia degli interventi vaccinali nei confronti di altre malattie e, più in generale, sulla suscettibilità degli animali ad altri patogeni di interesse per il settore avicolo. Parallelamente, la circolazione di ARV è risultata caratterizzata da elevata eterogeneità genetica, dalla rilevazione in diverse fasi del ciclo produttivo e dalla presenza di ceppi distinti anche all'interno dello stesso ciclo, configurando una situazione epidemiologica complessa. Il riscontro di ARV a livello articolare, limitato a ceppi appartenenti al Cluster 1 e associato a quadri di sinovite e tenosinovite, supporta inoltre il possibile ruolo di specifiche linee genetiche nello sviluppo di forme articolari di natura virale. CIAV, pur rappresentando un reperto meno frequente, è stato rilevato in più cicli produttivi e mantiene quindi un interesse epidemiologico, soprattutto ai fini dell'identificazione delle possibili vie di introduzione e persistenza dell'infezione in allevamento. La presenza di alterazioni timiche e fenomeni di deplezione linfoide nei soggetti positivi suggerisce che anche infezioni tardive e subcliniche possano contribuire, seppure in misura più limitata rispetto a IBDV e ARV, alla compromissione del sistema linfoide nei broiler dell'area oggetto di studio.

Nel complesso, i dati ottenuti confermano che le infezioni da virus immunodepressivi nei broiler possono avere una rilevanza patologica e immunologica anche in assenza di segni clinici specifici. L'integrazione di monitoraggio longitudinale, diagnostica molecolare, caratterizzazione filogenetica e valutazione istopatologica si conferma quindi uno strumento essenziale per distinguere la semplice rilevazione molecolare da un effettivo impatto sugli organi bersaglio. Tali evidenze forniscono indicazioni utili per l'ottimizzazione delle strategie di sorveglianza, controllo e prevenzione, inclusa la revisione dei protocolli vaccinali, la valutazione della finestra di suscettibilità rispetto al decadimento degli anticorpi materni, e il rafforzamento delle procedure di gestione e biosicurezza tra cicli produttivi.

BIBLIOGRAFIA

1. Balamurugan V and JM Kataria. (2006). Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken--current status. *Veterinary Research Communications*, 30: 541–566.
2. Bharathi R, Karthik K, Pazhanivel N, Hemalatha S, Shoba K, Roy P and G Dhinakar Raj. (2021). Histopathological study of infectious bursal disease and bursal lesion scoring for severity assessment in poultry flocks of Tamil Nadu. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9: 1142–1145.
3. 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 Pathology*, 50: 190-206.
4. Karel A. Schat, Michael A. Skinner, Chapter 14 - Avian immunosuppressive diseases and immune evasion, Editor(s): Bernd Kaspers, Karel A. Schat, Thomas W. Göbel, Lonneke Vervelde, *Avian Immunology (Third Edition)*, Academic Press, 2022, Pages 387-417, ISBN 978012818708
5. Kovács E, Varga-Kugler R, Mató T, Homonnay Z, Tatár-Kis T, Farkas S, Kiss I, Bányai K and V Palya. (2023). Identification of the main genetic clusters of avian reoviruses from a global strain collection. *Frontiers in Veterinary Science*, 9: 1094761.
6. Poletto F, Lizzi G, Legnardi M, Lupini C, Tucciarone CM, Franzo G, Giaccone V, Pedrazzoli S, Quaglia G, Graziosi G, De Nardi M, Catelli E and M Cecchinato. (2026). Molecular epidemiology of IBDV in Italy: emergence of Northwestern European reassortants (genotype A3B1) and co-circulation with local strains. *Avian Pathology*, 55: 103–110.
7. Quaglia G, Mescolini G, Catelli E, Berto G, Muccioli F and C Lupini. (2021). Genetic Heterogeneity among Chicken Infectious Anemia Viruses Detected in Italian Fowl. *Animals*, 11: 944.

PROCESSO LINFOPROLIFERATIVO A LOCALIZZAZIONE OCULARE IN UN GALLO ORNAMENTALE: È SEMPRE MALATTIA DI MAREK? CASO CLINICO CON REPERTI NECROSCOPICI, ISTOPATOLOGICI E IMMUNOISTOCIMICI

Zanardello C.¹, Giacomelli M.², Perina A.², Bortolami A.¹, Fiorentini L.³, Perulli S.³, Catania S.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Sede centrale - Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD);

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Sezione Territoriale di Verona - Via Bovolino, 1, 37060 Buttapietra (VR);

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via Don Eugenio Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC)

Summary

Avian lymphoid neoplasms pose a significant diagnostic challenge because of the overlapping clinical and pathological features associated with avian leukosis virus (ALV), Marek's disease virus (MDV), and reticuloendotheliosis virus (REV) infections. A 7-month-old ornamental rooster was submitted for necropsy following sudden death. Gross examination revealed marked hepatosplenomegaly, bilateral renal enlargement, and ocular abnormalities, including anisocoria, iris depigmentation, and thickening, findings that initially raised suspicion of Marek's disease. Histopathological examination demonstrated diffuse infiltration of multiple organs by medium- to large-sized neoplastic lymphoid cells. Immunohistochemistry revealed strong expression of CD45 and PAX5, with no expression of CD3, consistent with a B-cell lymphoid neoplasm. Molecular analysis showed negative results for MDV by real-time PCR, whereas end-point PCR detected ALV sequences compatible with subgroups A–E. The combined morphological, immunophenotypic, and molecular findings were most consistent with ALV-associated lymphoid leukosis. This case highlights the importance of integrating histopathology, immunohistochemistry, and molecular diagnostics for the accurate classification and differential diagnosis of avian lymphoid neoplasms, particularly when ocular involvement and other gross lesions mimic Marek's disease.

INTRODUZIONE

La leucosi aviare comprende un gruppo di neoplasie del sistema emopoietico associate all'infezione da virus della leucosi aviare (ALV), un retrovirus appartenente al genere *Alpharetrovirus* della famiglia *Retroviridae* (Regenmortel et al., 2000). La malattia può manifestarsi in diverse forme neoplastiche, tra cui eritroblastica, mieloblastica, mieloide e linfoblastica; tuttavia, la leucosi linfoide (LL) rappresenta la forma più frequente e di maggiore rilevanza epidemiologica negli allevamenti avicoli (Xie et al., 2024). I virus della leucosi aviare sono classificati in diversi sottogruppi sulla base delle caratteristiche antigeniche delle glicoproteine dell'envelope virale, che ne influenzano il tropismo cellulare, lo spettro d'ospite e i fenomeni di interferenza virale (Venugopal, 1999).

La LL è caratterizzata da un lungo periodo di incubazione, generalmente superiore a 16 settimane, e interessa prevalentemente soggetti di età superiore a 4–5 mesi. La trasformazione neoplastica origina dai linfociti B della borsa di Fabrizio e può successivamente estendersi a fegato, milza e altri organi viscerali, determinando la formazione di noduli bianco-grigiastri di dimensioni variabili. Dal punto di vista istologico, le lesioni sono ca-

ratterizzate da infiltrati costituiti da una popolazione relativamente monomorfa di cellule linfoidi immature (Dunn, 2022).

La diagnosi di LL si basa sull'identificazione delle lesioni macroscopiche e microscopiche tipiche, in particolare a carico della borsa di Fabrizio. Tuttavia, in assenza di tali alterazioni o in presenza di quadri neoplastici viscerali sovrapponibili, risulta essenziale la diagnosi differenziale con altre patologie neoplastiche del pollame, in particolare con la malattia di Marek (MDV) e con la reticoloendoteliosi virale (REV), entrambe caratterizzate da forme tumorali sistemiche che possono simulare clinicamente e patologicamente la LL.

La malattia di Marek (MDV) è una patologia neoplastica contagiosa del pollo causata da un *Alfaherpesvirus*, caratterizzata da trasformazione dei linfociti T, immunosoppressione, segni neurologici e tumori viscerali (Davison & Nair, 2004; Tulman et al., 2000; Kaboudi et al., 2025). Analogamente, la reticoloendoteliosi virale (REV), causata dal virus della reticoloendoteliosi aviare, appartenente alla famiglia *Retroviridae*, sottofamiglia *Gammaretrovirinae* (Ponnusamy et al. 2024) rappresenta un'ulteriore causa di neoplasie linfoproliferative nel pollame, contribuendo alla complessità della diagnosi differenziale (Purchase & Witter, 1975). Nei sistemi di allevamento, la co-circolazione di ALV, MDV e REV rende spesso difficile la distinzione clinico-patologica tra queste patologie (Fadly & Nair, 2008).

MATERIALI E METODI

Esame necroscopico

Una carcassa di pollo ornamentale (razza olandese ciuffata), maschio, di circa 7 mesi di età, è stata conferita per esame necroscopico presso il Laboratorio di Medicina Aviaria della sede territoriale di Verona dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. In anamnesi era riportata morte improvvisa.

Esame istopatologico e immunoistochimico

Campioni di milza, fegato, rene e bulbo oculare sono stati prelevati durante la necropsia, fissati in formalina tamponata al 10% per 48 ore e inviati al Laboratorio di Istopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per l'analisi istopatologica. I campioni fissati sono stati sottoposti a trimming, inclusi in paraffina secondo le procedure istologiche di routine, sezionati a 4 µm e colorati con ematossilina-eosina (EE). Oltre alla valutazione istopatologica, i campioni sono stati sottoposti ad indagini immunoistochimiche mediante metodica automatizzata utilizzando il sistema Discovery ULTRA (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA). A tal fine sono stati impiegati anticorpi diretti contro CD3, CD45 e PAX5. I dettagli relativi agli anticorpi utilizzati, alle diluizioni, alle procedure di recupero antigenico e ai sistemi di rivelazione sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Anticorpi e protocolli utilizzati nelle indagini immunoistochimiche. CC1: Cell Conditioning Solution 1, pH 8.4; RT: room temperature; RTU: ready to use.

Anticorpo	Origine e specificità	Clonalità	Recupero antigenico	Condizioni di incubazione	Sistema di rivelazione
CD3 (Agilent)	Rabbit anti-human	Polyclonal	CC1 95°C, 64 min	1:100 24 min 37°C	Discovery OmniMap anti-Rabbit HRP, ChromoMap DAB kit
CD45 (SouthernBiotech)	Mouse anti-Chicken	Monoclonal (LT40)	CC1 95°C, 40 min	1:40 44 min TA	Discovery OmniMap anti-Mouse HRP, ChromoMap DAB kit
PAX5 (ventana)	Rabbit anti-human	Monoclonal (SP34)	CC1 95°C, 64 min	RTU 32 min 37°C	Discovery anti-Rabbit HQ, Anti-HQ HRP, ChromoMap DAB kit

Brevemente, sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, dello spessore di 4 µm, sono state allestite su vetrini Superfrost Plus, deparaffinate e sottoposte a recupero antigenico mediante trattamento termico. L'immunorivelazione è stata effettuata mediante diaminobenzidina (DAB) come cromogeno. Le sezioni sono state successivamente controcolorate con ematossilina di Mayer, disidratate e montate per la valutazione microscopica. Per ogni anticorpo è stato incluso un campione di tessuto splenico come controllo positivo.

Esame di biologia molecolare

La ricerca del DNA di MDV è stata eseguita presso il Laboratorio di Virologia Speciale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie utilizzando una real-time PCR qualitativa descritta da Davidson et al. (2013) che ha come target una regione del frammento BamHI-H del genoma di MDV, target molecolare specifico per MDV. Tale regione è caratterizzata da un numero variabile di unità ripetute, la cui espansione è stata associata all'attenuazione del virus in seguito a passaggi seriali in coltura cellulare.

La ricerca dell'RNA di ALV è stata effettuata presso il Laboratorio della sede di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, mediante una PCR end-point secondo il metodo descritto da Smith et al. (1998). La metodica si basa sull'utilizzo di un primer comune, denominato H5, situato in una regione conservata del gene pol, condivisa dai sottogruppi virali A-E e J, associato a primer specifici posizionati a valle, in grado di determinare la specificità della reazione.

La coppia di primer H5/AD1 permette l'identificazione dei sottogruppi A-E, mentre le coppie H5/H2 e H5/H7, entrambe derivate dal gene env (gp85), sono specifiche per il sottogruppo J. In particolare, il sistema H5/H2 consente il riconoscimento delle sequenze archetipiche associate al ceppo prototipo HPRS-103; al contrario, la coppia H5/H7, progettata su una regione maggiormente conservata del gene env, permette di rilevare anche varianti antigeniche più recenti, caratterizzate da importanti differenze di sequenza rispetto al ceppo originario.

RISULTATI

Esame necroscopico

All'esame esterno la carcassa presentava uno stato di nutrizione scadente, con grave ipotrofia della muscolatura pettorale e deviazione dello sterno. Era evidente una marcata anisocoria, con la pupilla destra di diametro irregolare e notevolmente ridotto rispetto alla controlaterale, associata a depigmentazione ed ispessimento dell'iride. All'apertura della cavità celomatica si rilevava epatosplenomegalia marcata, associata a colorazione disomogenea di questi organi per la presenza di multifocali aree biancastre superficiali, estese in profondità nel parenchima, e petecchie emorragiche diffuse a livello epatico (Figura 1). I reni apparivano bilateralmente aumentati di volume, con colorazione disomogenea, pallida, variabile dal rosa al giallastro. Gli ureteri risultavano dilatati e contenenti depositi di urati nel lume. Non sono state osservate lesioni macroscopiche a carico degli altri organi.

Figura 1. Lesioni macroscopiche riscontrate a carico di occhio, fegato e milza.



Esame istopatologico e immunoistochimico

Tutti i tessuti esaminati presentavano una grave e diffusa infiltrazione da parte di una popolazione di cellule linfoidi neoplastiche di medio-grandi dimensioni, caratterizzate da nuclei rotondi vescicolosi con nucleoli evidenti, prevalentemente singoli. Il citoplasma era scarso ed eosinofilo e l'attività mitotica risultava elevata. Il quadro istopatologico era compatibile con una neoplasia linfoide a medio-grandi cellule (Figura 2).

Le indagini immunoistochimiche hanno evidenziato una diffusa positività nelle cellule neoplastiche per il marker pan-leucocitario CD45, con pattern membranario, e una marcata e diffusa positività nucleare per PAX5, marker associato alla linea B. L'anticorpo CD3, marker della linea T, ha evidenziato rari piccoli linfociti T intralesionali e perivasali con positività membranaria e citoplasmatica, mentre le cellule neoplastiche sono risultate negative. I reperti morfologici e immunofenotipici erano compatibili con un processo linfoproliferativo con fenotipo B (Figura 3).

Figura 2. Quadro istopatologico di fegato, rene e bulbo oculare colorati con ematossilina-eosina (EE): (a,b) fegato (5× e 40×); (c,d) rene (20× e 40×); (e,f) bulbo oculare (2,5× e 40×).

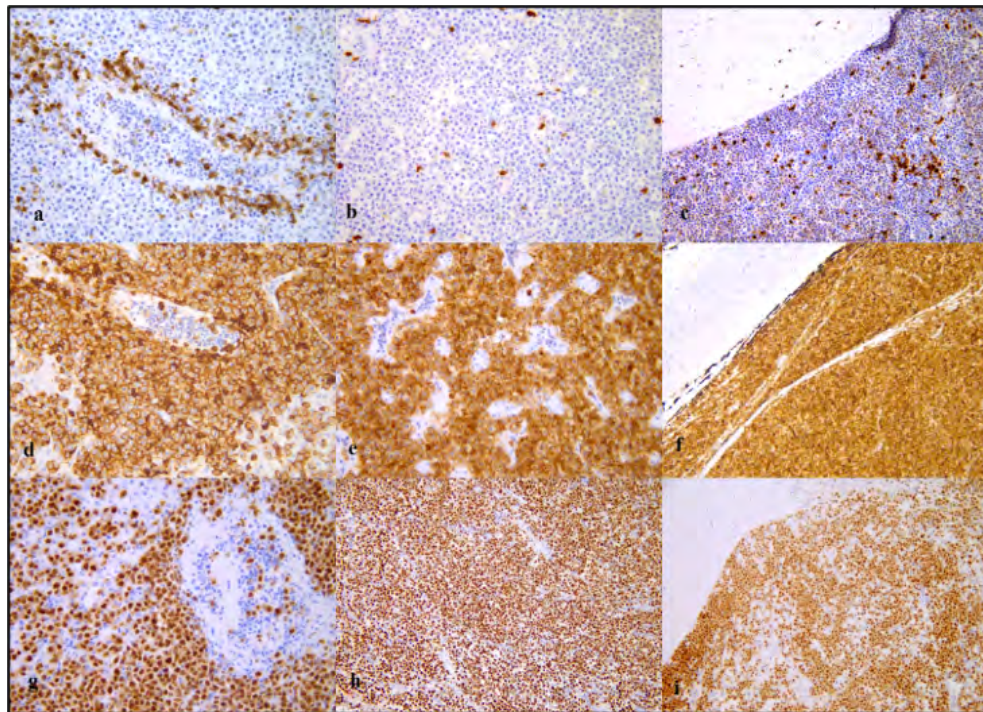
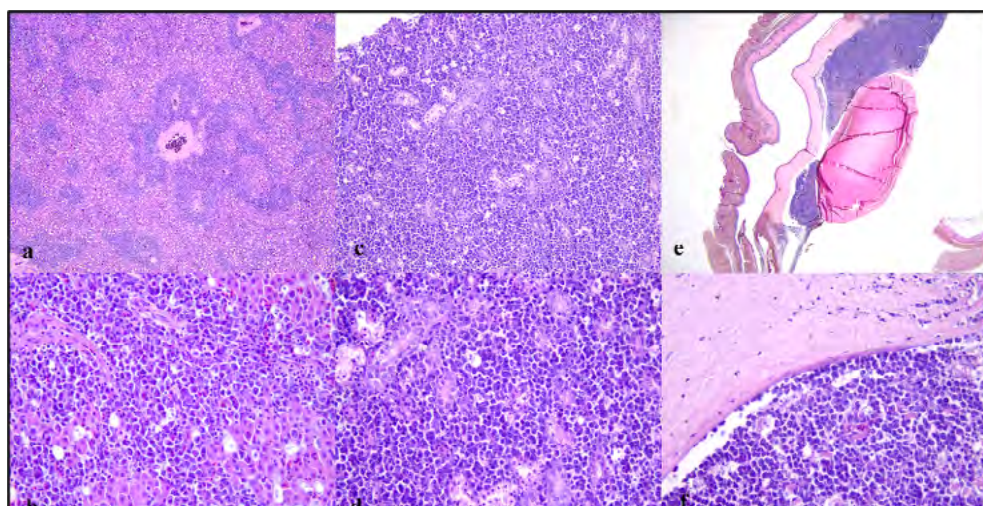


Figura 3. Quadro immunoistochimico di fegato, rene e bulbo oculare per CD3, CD45 e PAX5: (a,b,c) CD3 in fegato (40×), rene (40×) e bulbo oculare (20×); (d,e,f) CD45 in fegato (40×), rene (40×) e bulbo oculare (20×); (g,h,i) PAX5 in fegato (40×), rene (20×) e bulbo oculare (20×).



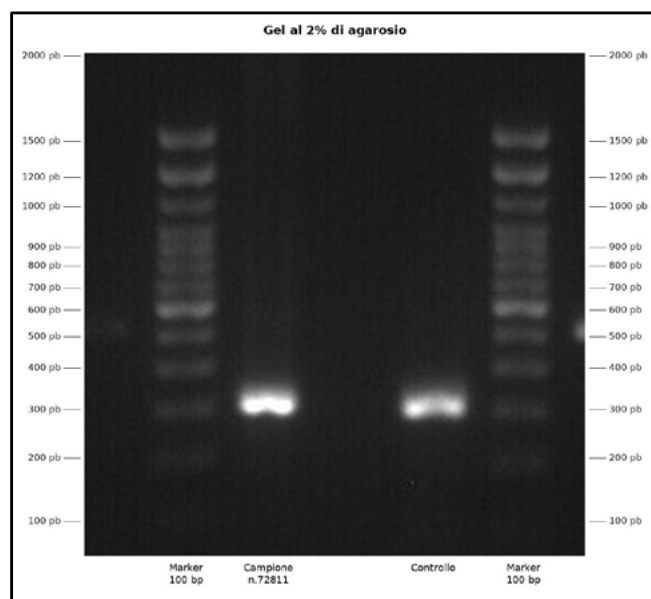
Esami virologici

Tutti i campioni analizzati sono risultati negativi per la ricerca di DNA di MDV.

Il campione di milza analizzato è risultato positivo per il virus della leucosi aviaria (ALV). I prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio al 2%, permettendo la visualizzazione di una banda di circa 300 bp, corrispondente al frammento target specifico dei sottogruppi A-E (Figura 4).

Il risultato molecolare ha pertanto confermato la presenza di materiale genetico riconducibile ad ALV nel campione esaminato.

Figura 4. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione mediante PCR end-point per ALV. La banda a sinistra corrisponde al campione analizzato, mentre la banda a destra rappresenta il controllo positivo. Il marker di peso molecolare da 100 bp è presente ai lati della corsa elettroforetica. La banda di circa 300 bp osservata nel campione risulta compatibile con la presenza di sequenze appartenenti ai sottogruppi A-E di ALV.



DISCUSSIONE

Le principali diagnosi differenziali dei linfomi nel pollo comprendono la malattia di Marek (MDV), la leucosi aviaria (ALV) e la reticuloendoteliosi (REV). In molti casi, una diagnosi presuntiva può essere formulata sulla base dell'anamnesi clinica e dell'esame istopatologico; tuttavia, in condizioni di campo, sono frequenti i casi di neoplasie aviarie associate a infezioni miste sostenute da questi virus, per i quali risulta necessario il ricorso a metodiche diagnostiche avanzate (Sani et al., 2022). La diagnosi presuntiva deve pertanto essere confermata, poiché, come evidenziato nel presente caso, i soli dati anamnestici e la distribuzione anatomica delle lesioni possono non essere sufficienti per una corretta definizione eziologica. Nel caso descritto, il quadro necroscopico, caratterizzato dalla presenza di un processo linfoproliferativo neoplastico a distribuzione viscerale e oculare in un gallo ornamentale di 7 mesi, aveva inizialmente orientato il sospetto diagnostico verso la malattia di Marek, in

relazione all'età dell'animale e alla distribuzione delle lesioni. In particolare, le lesioni linfoproliferative oculari rappresentano un reperto frequentemente descritto nell'infezione da MDV (Nair *et al.*, 2020).

L'esame istopatologico ha confermato la natura linfoproliferativa del processo, mentre la caratterizzazione immunoistochimica ha evidenziato la positività delle cellule neoplastiche per CD45 e PAX5, indicandone l'origine B-cellulare, e la negatività per CD3. Tale profilo immunofenotipico, associato alla negatività della PCR per MDV, ha indirizzato il sospetto diagnostico verso una neoplasia linfoide di origine B-cellulare, rendendo necessario il confronto con le principali neoplasie linfoidi aviarie di origine virale, in particolare la leucosi linfoide (LL) e la reticoloendoteliosi (REV). Quest'ultima può infatti rappresentare un'ulteriore importante differenziale, potendo indurre neoplasie linfoidi con fenotipo variabile, incluse forme B-cellulari a carico della borsa di Fabrizio e di altri organi (Nair, 2014). Sebbene i reperti morfologici e immunofenotipici consentano di orientare il sospetto diagnostico verso una specifica linea cellulare e di restringere il campo delle diagnosi differenziali, la distinzione definitiva tra le diverse forme di neoplasia linfoide associate a infezioni virali richiede l'impiego di metodiche di biologia molecolare, in grado di identificare e caratterizzare gli agenti eziologici coinvolti. Nel presente caso, l'analisi molecolare mediante PCR end-point ha evidenziato la presenza di sequenze compatibili con ALV riconducibili ai sottogruppi A–E. La metodica impiegata non consente tuttavia di distinguere in maniera assoluta tra sequenze virali esogene responsabili di infezione e provirus endogeni integrati nel genoma dell'ospite; il dato molecolare è risultato coerente con il quadro anatomo-patologico, istologico e immunofenotipico osservato. L'integrazione dei dati molecolari con i reperti morfologici ha pertanto supportato la diagnosi di leucosi linfoide associata ad ALV.

CONCLUSIONE

Il presente caso evidenzia come la sola valutazione della sede anatomica delle lesioni e del quadro istopatologico possa indirizzare verso un sospetto diagnostico non definitivo. L'integrazione tra indagini morfologiche, immunoistochimiche e molecolari si è dimostrata fondamentale per la corretta caratterizzazione delle neoplasie linfoidi aviarie, soprattutto in presenza di localizzazioni suggestive ma non patognomoniche, come il coinvolgimento oculare osservato.

BIBLIOGRAFIA

1. Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and RB Wickner (eds). (2000). Alpharetroviruses. In *Virus Taxonomy-Classification and Nomenclature of Viruses*, pp. 373-374. Academic Press, New York.
2. Xie Z, Ma X, Wang X, Zhang R, Zhang T, Ma M, Shi F and Chen C. (2024). Rapid and sensitive visual detection of avian leukosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow immunochromatographic strip assay. *Archives of Virology*, 169: 94.
3. Venugopal K. (1999). Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. *Research in Veterinary Science*, 67: 113-119.
4. Dunn J. (2022). Lymphoid leucosis in poultry (Avian leucosis). MSD Manual Veterinary Manual.
5. Davison F and V Nair. (2004). Marek's Disease: An Evolving Problem (pp. 156–163). London: Elsevier Academic Press.
6. Tulman E, Afonso C, Lu Z, Zsak L, Rock D and GF Kutish. (2000). The genome of a very virulent Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 74: 7980–7988.

7. Kaboudi K, Mkadem E and A Amara. (2025). Prevalence, Gross Pathology, and Histopathology of Marek's Disease in Backyard Chickens in Northeastern Tunisia. *Journal of World's Poultry Research*, 15: 81-91.
8. Ponnusamy P, Sasikala M, Babuprasath N and T Lurthu Reetha. (2024). Molecular characterization and histopathological analysis of avian reticuloendotheliosis virus from guinea fowl in Tamil Nadu. *Exploratory Animal and Medical Research*, 15.
9. Purchase HG and RL Witter. (1975). The reticuloendotheliosis viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 71: 103–124.
10. Fadly A and V Nair. (2008). Leukosis/sarcoma group. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* 12th edn (pp. 541–568). Ames: Iowa State Press
11. Davidson I, Raibshstein I and A Al-Touri. (2013). Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally infected chickens and commercial chickens by multiplex real-time PCR. *Avian Diseases*, 57: 532-538.
12. Smith LM, Brown SR, Howes K, McLeod S, Arshad SS, Barron GS, Venugopal K, McKay JC and LN Payne. (1998). Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. *Virus Research*, 54: 87–98.
13. Sani N, Ugochukwu I, Abalaka SE, Saleh A, Idoko I, Oladele S, Abdu P, Njoku C and J Dunn. (2022). Immunohistochemical and molecular detection of avian neoplastic disease viruses in layer chickens from poultry farms in Northwestern and Northcentral Nigeria. *Comparative Clinical Pathology*, 31: 719-727.
14. Nair V, Gimeno I and J Dunn. (2020). Marek's Disease. In: Swayne DE (Ed.), *Diseases of Poultry*, 14th Edition, Wiley Blackwell, Hoboken, New Jersey, pp. 550-587.
15. Nair V. (2014). Tumors of the avian immune system. In: *Avian Immunology*. Elsevier/Academic Press.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI CLINICI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI DA POLLI DI ALLEVAMENTI COMMERCIALI

Giovanardi D.¹, Zandonà L.², Moschioni C.², Tonon E.², Bacchin C.², Rizzardi A.², Luisetto P.³, Cesca A.³, Drigo I.², Bano L.²

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;

³Medico Veterinario libero professionista.

Summary

Staphylococcus aureus (Sa) is an important bacterial pathogen that causes disease in humans and a wide range of animal species, including poultry. In commercial poultry production, *Sa* infections are associated with arthritis, tenosynovitis, osteomyelitis, omphalitis, and acute septicemia, leading to sudden mortality, particularly in laying hens. These bacterial diseases cause significant economic losses due to increased mortality, higher carcass condemnation rates, and greater antimicrobial use. In this study, 28 *Sa* of chicken origin (broiler breeders, broiler chickens, laying hens) were genetically characterized by means of the spa-typing and MLST methods. Most isolates (24/28) belonged to spa type t3478, while the remaining isolates were classified as t002, t548, t3266, and t16266. MLST analysis revealed that the majority of isolates (27/28) belonged to sequence type ST-05, whereas one isolate was identified as ST130. ST-05 clustered within clonal complex CC5, one of the most widespread *Sa* lineages reported in poultry worldwide. The detection of the ST-05 clone in both broiler chickens and breeder flocks across different production chains suggests possible vertical transmission from parent stocks and/or the high capacity of these strains to persist in the farm environment.

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus (Sa) è un importante patogeno batterico in grado di causare malattia nell'uomo e in diverse specie animali, incluse quelle aviari. Nel pollame allevato, le infezioni sostenute da *Sa* possono portare ad artrosinoviti, tendiniti, osteomieliti, onfaliti e a casi di setticemia acuta con mortalità improvvisa nelle galline ovaiole (Andreasen, 2020). Le malattie batteriche possono causare ingenti perdite economiche dovute all'aumento della mortalità, all'incremento degli scarti al macello e al maggiore consumo di antimicrobici in allevamento. Quest'ultimo aspetto è particolarmente rilevante in relazione al noto problema delle antimicrobicoresistenze. Per quanto riguarda *Sa*, sono particolarmente attenzionati i ceppi resistenti alla meticillina (MRSA), in quanto associati a resistenze più estese alla classe dei beta-lattamici, le cui infezioni, soprattutto in medicina umana, risultano di difficile trattamento.

La tipizzazione molecolare dei Sa, attraverso metodiche quali spa-typing (tipizzazione della proteina A) e MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*), consente di confrontare i differenti ceppi batterici per valutazioni epidemiologiche, individuando una o più popolazioni clonali all'interno di una o più specie animali ospiti. Attraverso questo studio di caratterizzazione molecolare si è voluto indagare aspetti epidemiologici di ceppi clinici di *Sa* circolanti in allevamenti commerciali di polli da carne, riproduttori pesanti e galline ovaiole.

MATERIALI E METODI

Isolati Batterici

Sono stati inclusi nello studio 28 ceppi di *Sa* isolati da pollo. Le informazioni relative alla tipologia produttiva (riproduttore pesante, broiler, gallina ovaioia), all'età e all'allevamento d'origine sono riportate nella tabella 1. I ceppi, provenienti da diverse filiere, sono stati isolati da campioni patologici, individuati in sede di esame anatomo-patologico, attraverso esame batteriologico condotto sui terreni agar sangue, Baird Parker agar ed Eosin Methilen Blue agar, incubate a 37 °C in aerobiosi per 24-48 ore. L'identificazione è stata effettuata mediante MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germania) e i ceppi sono stati conservati in cryovials a -80°C sino all'esecuzione dei saggi biomolecolari.

Spa-typing

Lo *spa-typing* rappresenta uno dei principali metodi di caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Sa*. Utilizzato per studi epidemiologici dei ceppi MRSA, tale metodica si basa sull'amplificazione della regione X polimorfica della proteina A e sull'analisi della sua sequenza mediante il software Ridom StaphType. La regione X della proteina A di *S. aureus* è infatti, caratterizzata dalla presenza di ripetizioni di circa 24 pb variabili in sequenza e numero. La diversa combinazione di queste ripetizioni determina lo *spa-type* del ceppo (Harmsen *et al.*, 2003).

Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

L'MLST è uno dei principali metodi di caratterizzazione molecolare delle specie batteriche. Per *Sa* tale metodica prevede l'amplificazione mediante 7 diverse PCR di una porzione dei geni house-keeping *aroE*, *arcc*, *gmk*, *glpf*, *tpi*, *pta* e *yqil* e l'analisi della loro sequenza mediante il sito web <http://saureus.mlst.net/>. La combinazione degli alleli dei 7 geni fornisce il sequence type (ST) del ceppo (Enright *et al.*, 2000).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati sono riassunti in Tabella 1.

Tabella1. Caratteristiche dei gruppi da cui sono stati isolati i ceppi inclusi nello studio e risultati ottenuti mediante Spa-typing e MLST.

*TTM: tibio-tarso-metatarsale

N°	Tip. Produttiva	Età (giorni)	Sito isolamento	Allev.	Spa-type	MLST
1	pollo riproduttore	1	sacco vitellino	A	t3478	ST-05
2	pollo carne	4	sacco vitellino	B	t3478	ST-05
3	pollo riproduttore	175	articolazione TTM*	C	t3478	ST-05
4	pollo riproduttore	14	articolazione TTM	A	t3478	ST-05
5	pollo riproduttore	63	articolazione TTM	D	t3478	ST-05
6	pollo carne	3	sacco vitellino	E	t3478	ST-05
7	pollo riproduttore	98	articolazione TTM	D	t3478	ST-05
8	pollo riproduttore	70	articolazione TTM	F	t3478	ST-05
9	gallina ovaioia	ND	milza	G	t002	ST-05
10	pollo carne	3	sacco aereo	H	t3478	ST-05
11	pollo carne	8	cervello	I	t3478	ST-05
12	pollo carne	4	sacco vitellino	L	t548	ST-05
13	pollo carne	4	sacco vitellino	M	t3478	ST-05
14	pollo carne	3	proventricolo	N	t3266	ST-130
15	pollo riproduttore	84	articolazione TTM	O	t3478	ST-05
16	pollo riproduttore	1	sacco vitellino	P	t3478	ST-05
17	pollo riproduttore	12	articolazione TTM	Q	t3478	ST-05
18	pollo carne	4	sacco vitellino	R	t3478	ST-05
19	pollo riproduttore	77	articolazione TTM	S	t3478	ST-05
20	pollo riproduttore	19	articolazione TTM	T	t3478	ST-05
21	pollo riproduttore	1	sacco vitellino	Y	t3478	ST-05
22	pollo riproduttore	14	articolazione TTM	F	t3478	ST-05
23	pollo riproduttore	40	articolazione TTM	T	t3478	ST-05
24	pollo carne	7	sacco vitellino	U	t16266	ST-05
25	pollo riproduttore	24	articolazione TTM	O	t3478	ST-05
26	pollo carne	20	articolazione TTM	W	t3478	ST-05
27	pollo carne	4	sacco vitellino	Z	t3478	ST-05
28	pollo riproduttore	70	articolazione TTM	A	t3478	ST-05

Ventiquattro ceppi sono risultati *spa*-type t3478 mentre i rimanenti 4 sono risultati appartenere a 4 differenti *spa*-type (t002, t548, t3266 e t16266). L'analisi MLST ha evidenziato che la quasi totalità dei ceppi (27/28) apparteneva al sequence type ST-05: un ST che raggruppa anche ceppi con differenti *spa*-type (t3478, t002, t548 e t16266). Un solo ceppo è risultato essere t3266/ST-130. I nostri risultati dimostrano la circolazione trasversale in Italia, tra diverse filiere e comparti, di *Spa*-type diversi da quelli riportati nei pochi e datati studi condotti a livello europeo in Polonia e Germania (Bystroń et al., 2010; Monecke et al. 2013). Tuttavia, già in questi studi, era stata rilevata la presenza dello *Spa*-type t002.

In due allevamenti di polli riproduttori ("A" e "D") il clone t3478/ST-05 è stato isolato ripetutamente nello stesso ciclo produttivo. In particolare, in "A" questo clone è stato isolato una volta dal sacco vitellino e successivamente dalle articolazioni tibio-tarso-metatarsali, mentre in "D" è stato ritrovato due volte (a 63 e 98 gg) nelle articolazioni del garretto. Un altro aspetto saliente è che nell'allevamento "A", così come negli allevamenti "F" e "O", lo stesso clone è stato rinvenuto in cicli produttivi successivi.

L'isolamento di *Sa* da sacco vitellino in polli riproduttori è avvenuto negli allevamenti "A", "P" e "Y".

Nei polli da carne, il clone t3478/ST-05 è stato isolato da sacco vitellino, sacchi aerei e cervello. Questo dimostra la mancanza di un tropismo particolare di questo clone per un apparato e la capacità di causare malattia in diversi distretti, raggiunti anche presumibilmente per via ematogena, come cervello e milza.

Infine, l'unico isolato del clone t3478/ST-05 in riproduttori in fase di deposizione "C" non è epidemiologicamente correlabile ai polli da carne "E", "R", "W" e "Z".

L'elevata diffusione di questo clone presente trasversalmente nel comparto del pollo commerciale, potrebbe essere legata alla capacità di questi ceppi, una volta entrati in allevamento, di permanere nell'ambiente e/o di essere trasmessi verticalmente da gruppi parentali e/o gran-parentali portatori di questi ceppi "epidemici". Il suo ritrovamento, anche nel sacco vitellino di riproduttori di 1 giorno, fa ritenere una sua possibile presenza anche nei gruppi gran-parentali.

Non sappiamo se la capacità di causare malattia di questo ceppo sia collegabile a fattori di virulenza particolari, non ancora indagati, oppure alla simultanea azione di fattori predisponenti di natura infettiva (es. reovirus) o ambientale (es. traumatismi).

Monecke e colleghi (2013) hanno caratterizzato ceppi isolati da tacchini, polli da carne e galline ovaiole, evidenziando che i ceppi isolati dalla specie *Gallus gallus* sono per la maggior parte ST-05 (44/51 isolati) e tutti erano *mecA* negativi (ceppi sensibili alla meticillina, non MRSA). Bystroń e colleghi (2010) hanno caratterizzato, mediante *spa*-typing, 42 ceppi isolati da polli riproduttori, galline ovaiole, tacchini e oche. Gran parte dei ceppi isolati da polli riproduttori e ovaiole era t002 (18/33 isolati).

Da un punto di vista filogenetico, *Sa* è considerato un patogeno batterico che primariamente ha colonizzato l'uomo e, successivamente, diverse specie animali, a seguito di eventi di *host-switching* in cui *Sa* si è adattato ai nuovi ospiti mediante l'acquisizione e/o la perdita di elementi genetici mobili (MGE). I contatti ravvicinati tra l'uomo e gli animali hanno facilitato gli eventi di *host-switching*, in particolare la domesticazione degli animali e l'industrializzazione della zootecnia (Haag et al., 2019). L'abilità di adattamento di *Sa* è legata all'enorme proporzione di MGE nel suo genoma e alla sua capacità di scambio attraverso contatti con l'ambiente. I ceppi ST-05 sono quelli che più frequentemente causano malattia nelle specie avicole (Haag et al, 2019). Pare che questi ceppi siano il risultato di adattamenti di ceppi umani alle specie avicole, come la capacità di crescere a 42°C (associata a 2 geni presenti nei ceppi avicoli, SAAV_0062 e SAAV_0064) e una maggiore emolisi su piastre agar addizionate con sangue di pollo (Murray et al., 2017).

CONCLUSIONI

A conoscenza degli autori, questo è il primo lavoro di caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Sa* isolati da pollo in Italia, che andrà esteso aumentando la collezione di ceppi caratterizzati. I risultati dimostrano l'elevata diffusione del clone t3478/ST-05 sia negli allevamenti di polli riproduttori sia in quelli di polli da carne appartenenti a diverse filiere commerciali. Questi dati ottenuti possono essere utilizzati per pianificare strategie di controllo delle infezioni da *Sa* negli allevamenti di polli da carne, di riproduttori pesanti e di galline ovaiole.

BIBLIOGRAFIA

1. Andreasen CB. (2020). Staphylococcosis in: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, et al., eds. Diseases of Poultry. 14th ed. Vol X. John Wiley & Sons; 2020 (pp. 995 - 1003).
2. Bystron J, Podkowik M, Piasecki T, Wieliczko A, Molenda J and J Bania. (2010). Genotypes and enterotoxin gene content of *S. aureus* isolates from poultry. *Veterinary Microbiology*, 144: 498-501.
3. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ and BG Spratt. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 1008-1015.
4. Haag AF, Fitzgerald JR and JR Penadés. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*, 7: 10-1128.
5. Lowder BV, Guinane CM, Ben Zakour NL, Weinert LA, Conway Morris A, Cartwright RA. Simpson AJ, Rambaut A, Nübel U and JR Fitzgerald JR (2009). Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 106: 19545–19550.
6. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger J, Claus H, Turnwald D, and U Vogel. (2003). Typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5442-8.
7. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, and BG Spratt. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 3140-5.
8. Monecke S, Ruppelt A, Wendlandt S, Schwarz S, Slickers P, Ehrlich R and SC Jäckel. (2013). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from diseased poultry. *Veterinary Microbiology*, 162: 806-812.
9. Murray S, Pascoe B, Méric G, Mageiros L, Yahara K, Hitchings MD, Friedmann Y, Wilkinson TS, Gormley FJ, Mack D, Bray JE, Lambie S, Bowden R, Jolley KA, Maiden MCJ, Wendlandt S, Schwarz S, Corander J, Fitzgerald JR and SK Sheppard. (2017). Recombination-Mediated Host Adaptation by Avian *Staphylococcus aureus*. *Genome Biology and Evolution*, 9: 830-842.



**PREMIO CORRADO LONGONI
VINCITORE**

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV) IN ITALIA: EMERGENZA DI CEPPI RIASSORTANTI EUROPEI NORD-OCCIDENTALI (GENOTIPO A3B1) E DINAMICHE DI CO-CIRCOLAZIONE CON CEPPI AUTOCTONI

Poletto F.¹, Lizzi G.², Legnardi M.¹, Lupini C.², Tucciarone C.M.¹, Franzo G.¹, Giaccone V.¹, Pedrazzoli S.^{2,1}, 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 major pathogen of poultry, causing immunosuppression and significant economic losses worldwide. IBDV exhibits extensive genetic diversity driven by mutation and genome reassortment. In recent years, reassortant strains belonging to genotype A3B1, first identified in Northwestern Europe in 2017, have rapidly spread across several European countries. Until recently, Italy appeared to be characterized by the exclusive circulation of a distinct A3B1 clade related to Russian and Middle Eastern strains (ITA/RUS/ME). However, the recent emergence of Northwestern European reassortants has raised concerns regarding their epidemiological impact. This study provides an updated overview of IBDV molecular epidemiology in Italy based on the analysis of 256 bursal samples collected from broiler farms between March 2023 and January 2025. Molecular detection and phylogenetic characterization were performed targeting both VP2 and VP1 genes, as previously described. Field strains were detected in 38% of samples (97), vaccine strains in 17% (43), and 45% tested negative (116). Among field strains, 47% (46) were classified as Northwestern European reassortants, while 52% (50) belonged to the ITA/RUS/ME clade. One sample showed evidence of reassortment or co-infection between field and vaccine strains. Following their first detection in December 2023, in Italy, Northwestern European reassortants rapidly spread across major poultry-producing regions, suggesting a possible epidemiological advantage, as already observed in other European countries. These findings highlight the dynamic nature of IBDV evolution and emphasize the need for continuous molecular surveillance and updated control strategies.

INTRODUZIONE

La bursite infettiva (IBD), nota anche come malattia di Gumboro, è una patologia virale altamente contagiosa che colpisce soprattutto i polli giovani tra le 2 e le 6 settimane di età. Rappresenta una delle principali problematiche sanitarie per l'industria avicola globale a causa delle significative perdite economiche dirette e indirette associate all'infezione (Eterradossi & Saif, 2019). L'agente eziologico, il virus della bursite infettiva (IBDV), mostra un marcato tropismo per la borsa di Fabrizio, un organo linfatico primario essenziale per lo sviluppo e la maturazione dei linfociti B. Il danno a questo organo comporta immunosoppressione, rendendo gli animali più suscettibili a infezioni secondarie, riducendo le performance produttive e compromettendo l'efficacia dei programmi vaccinali (Eterradossi & Saif, 2019). Dal punto di vista clinico, la malattia può manifestarsi con segni aspecifici quali depressione,

piumaggio arruffato, anoressia e disidratazione, spesso associati a lesioni macroscopiche a carico della borsa di Fabrizio e a emorragie nei muscoli di cosce e petto. Tuttavia, alcune varianti virali possono determinare infezioni subcliniche, rendendo più complessa l'identificazione dei focolai sulla base dei soli segni clinici (Mató et al., 2020). IBDV appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*, ed è caratterizzato da un genoma a RNA a doppio filamento suddiviso in due segmenti, A e B. Il segmento A codifica diverse proteine, tra cui la proteina capsidica VP2, principale determinante antigenico del virus, la proteina *scaffold* VP3, la proteasi VP4 e la proteina non strutturale VP5; il segmento B codifica invece la RNA polimerasi RNA-dipendente VP1 (Zhang et al., 2022). IBDV è classificato in due sierotipi: il sierotipo 1, patogeno, e il sierotipo 2, generalmente avirulento. I ceppi appartenenti al sierotipo 1 sono stati storicamente suddivisi in ceppi classici, varianti e *very virulent*, sulla base delle loro caratteristiche antigeniche e della patogenicità. I ceppi classici, descritti per la prima volta negli anni '60 (Cosgrove, 1962), sono associati a quadri clinici tipici; i ceppi varianti presentano differenze antigeniche rilevanti e sono spesso responsabili di infezioni subcliniche; i ceppi *very virulent* causano invece forme più gravi della malattia, caratterizzate da elevata mortalità (Etteradossi & Saif, 2019). Come altri virus a RNA, IBDV è soggetto a un'elevata variabilità genetica dovuta a mutazioni puntiformi e deriva antigenica, che rappresentano una sfida significativa per il controllo della malattia (Zhang et al., 2022). In particolare, mutazioni nella regione ipervariabile della proteina VP2 possono modificare i principali epitopi antigenici, favorendo l'evasione della risposta immunitaria e riducendo l'efficacia dei vaccini (Jackwood & Sommer-Wagner, 2007). A ciò si aggiunge la capacità del virus di andare incontro a riassortimento genetico tra i due segmenti genomici, un meccanismo evolutivo che contribuisce all'emergere di nuovi genotipi e aumenta ulteriormente la complessità epidemiologica dell'infezione (He et al., 2016; Mató et al., 2020). Negli ultimi anni, l'introduzione di sistemi di classificazione basati sulla filogenesi ha consentito una caratterizzazione più accurata della diversità genetica di IBDV. In particolare, il sistema proposto da Islam et al. (2021) ha identificato diversi genogruppi a livello dei geni VP2 (A0–A8) e VP1 (B1–B5), successivamente ampliati con l'aggiunta di ulteriori genotipi, come A9 (Legnardi et al., 2022). La combinazione di questi genogruppi consente di definire genotipi compositi (es. A1B1, A2B1, A3B2...), migliorando la comprensione delle relazioni evolutive tra i ceppi virali. L'analisi combinata di VP2 e VP1 è particolarmente rilevante sia per il loro ruolo nella determinazione dell'antigenicità e della patogenicità (Letzel et al., 2007; Escaffre et al., 2013), sia per la possibilità di individuare eventi di riassortimento tra segmenti genomici differenti (Mató et al., 2020; He et al., 2016). Nel contesto europeo, questi approcci hanno permesso di identificare un importante cambiamento epidemiologico associato all'emergere dei riassortanti dell'Europa nord-occidentale (NW EU), appartenenti al genotipo A3B1. Questi ceppi, rilevati per la prima volta nel 2017, si sono rapidamente diffusi in numerosi paesi europei, diventando frequentemente predominanti (Mató et al., 2020; Mató et al., 2022; Legnardi et al., 2023; Piķula et al., 2023; Reddy et al., 2024). Essi derivano da eventi di riassortimento tra ceppi attenuati classici e ceppi *very virulent* e sono stati associati sia sperimentalmente sia in condizioni di campo a infezioni subcliniche, rendendo più difficile la loro individuazione basata esclusivamente sui segni clinici. Nonostante ciò, il loro potenziale immunosoppressivo rappresenta un fattore di rischio rilevante per la salute degli allevamenti (Mató et al., 2020). Nel panorama epidemiologico europeo, l'Italia ha rappresentato per lungo tempo un caso peculiare, caratterizzato dall'assenza apparente dei riassortanti NW EU e dalla presenza di un distinto clade A3B1 correlato a ceppi identificati in Russia, Kazakistan e in diversi paesi del Medio Oriente (Michel & Jackwood, 2017; Le-

gnardi et al., 2023). Le ragioni alla base di questa distribuzione differenziale non sono ancora completamente chiarite e rappresentano un importante ambito di indagine. Alla luce di queste premesse, il presente studio si propone di analizzare l'evoluzione recente dell'epidemiologia di IBDV in Italia, documentando l'introduzione dei riassortanti NW EU e descrivendo le dinamiche di co-circolazione con la clade autoctona A3B1.

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 effettuate in allevamenti italiani di polli da carne nel periodo compreso tra marzo 2023 e gennaio 2025. È stata adottata una strategia di campionamento di convenienza, in quanto la raccolta dei campioni è avvenuta in base alla disponibilità delle aziende private. In totale, sono stati considerati 256 allevamenti appartenenti a diverse filiere produttive. In ciascuna azienda è stato raccolto un campione costituito da pool di borse di Fabrizio, conferite tal quale oppure impresse su FTA™ card (GE Healthcare UK Limited, Amersham, Regno Unito). Gli allevamenti erano localizzati in diverse regioni italiane ad alta densità avicola, in particolare Emilia-Romagna (99), Veneto (75), Marche (37), Lombardia (21), Umbria (11), Lazio (11) e Piemonte (2). L'età degli animali al momento del campionamento era compresa tra 18 e 59 giorni, con una media di 35,4 giorni. Per quanto riguarda i protocolli vaccinali, 157 allevamenti erano stati vaccinati con vaccini vettorizzati, 35 con vaccini a immunocomplessi, 3 con vaccini vivi attenuati, mentre un gruppo era stato sottoposto a una combinazione di vaccini vettorizzati e vivi. Tre allevamenti non erano stati vaccinati, mentre per 57 aziende non erano disponibili informazioni relative al protocollo vaccinale adottato. Le informazioni cliniche erano disponibili per 112 allevamenti su 256. Le principali manifestazioni osservate includevano enterite, zoppia, piumaggio arruffato, deformità e colibacillosi, oltre a segni aspecifici quali scarso accrescimento. Nei restanti allevamenti non sono stati riportati sintomi oppure non erano disponibili informazioni sulla sintomatologia.

Processazione dei campioni ed estrazione degli acidi nucleici

Le analisi molecolari sono state condotte presso il Laboratorio di Biotecnologie e Malattie Infettive del Dipartimento MAPS dell'Università di Padova (Legnaro, Italia) e presso il Laboratorio di Biologia Molecolare del Servizio di Patologia Aviare del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna (Ozzano dell'Emilia, Italia). Le impronte di borsa su FTA™ card sono state trattate mediante eluizione di frammenti di circa 5 mm² in 1 ml di soluzione tampone PBS 1×, mentre i campioni di organo sono stati omogeneizzati in 3 ml della stessa soluzione. I campioni sono stati vortexati e successivamente sottoposti a estrazione degli acidi nucleici utilizzando il kit High Pure (Roche, Basilea, Svizzera), seguendo le istruzioni del produttore. Gli eluati e gli acidi nucleici estratti sono stati conservati a -80 °C per tutta la durata dello studio.

Analisi molecolari

Le analisi dei geni VP2 e VP1 sono state eseguite mediante RT-PCR utilizzando il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, Waltham, MA, USA). Per l'amplificazione della regione ipervariabile del gene VP2 sono stati utilizzati i primer 743-1 (5'-GCCCAGAGTCTACACCAT-3') e 743-2 (5'-CCCG-GATTATGTCTGA-3') (Jackwood & Sommer-Wagner, 2005), mentre per il sequenziamento parziale del gene VP1 sono stati impiegati i primer B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTAT-GAGACCGA-3') e B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') (Islam et al., 2012). L'amplificazione del gene VP1 è stata effettuata esclusivamente sui campioni risultati

positivi per ceppi di campo nelle analisi preliminari. I prodotti di amplificazione positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger presso il Macrogen Europe Milan Genome Center (Milano, Italia), utilizzando gli stessi primer impiegati per la RT-PCR. I cromatogrammi ottenuti sono stati analizzati e rifiniti mediante il software FinchTV (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA), mentre le sequenze consenso sono state assemblate utilizzando ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD, Australia).

Analisi filogenetiche

Sono stati costruiti due dataset distinti, uno per ciascun segmento genomico (VP2 e VP1), integrando le sequenze ottenute con ceppi di riferimento rappresentativi dei diversi genogruppi descritti in letteratura secondo la classificazione di Islam et al. (2021). Le sequenze sono state allineate mediante l'algoritmo MUSCLE implementato nel software MEGA 12 (Kumar et al., 2024). Le analisi filogenetiche sono state condotte utilizzando il metodo della massima verosimiglianza (*Maximum Likelihood*), applicando il modello di sostituzione nucleotidica con il miglior punteggio secondo il criterio BIC (*Bayesian Information Criterion*) e utilizzando un approccio di *bootstrapping* adattivo con soglia del 5%. Gli alberi filogenetici ottenuti sono stati esportati in formato Newick e successivamente visualizzati e modificati mediante il software online Interactive Tree Of Life (iTOL) (Letunic & Bork, 2021).

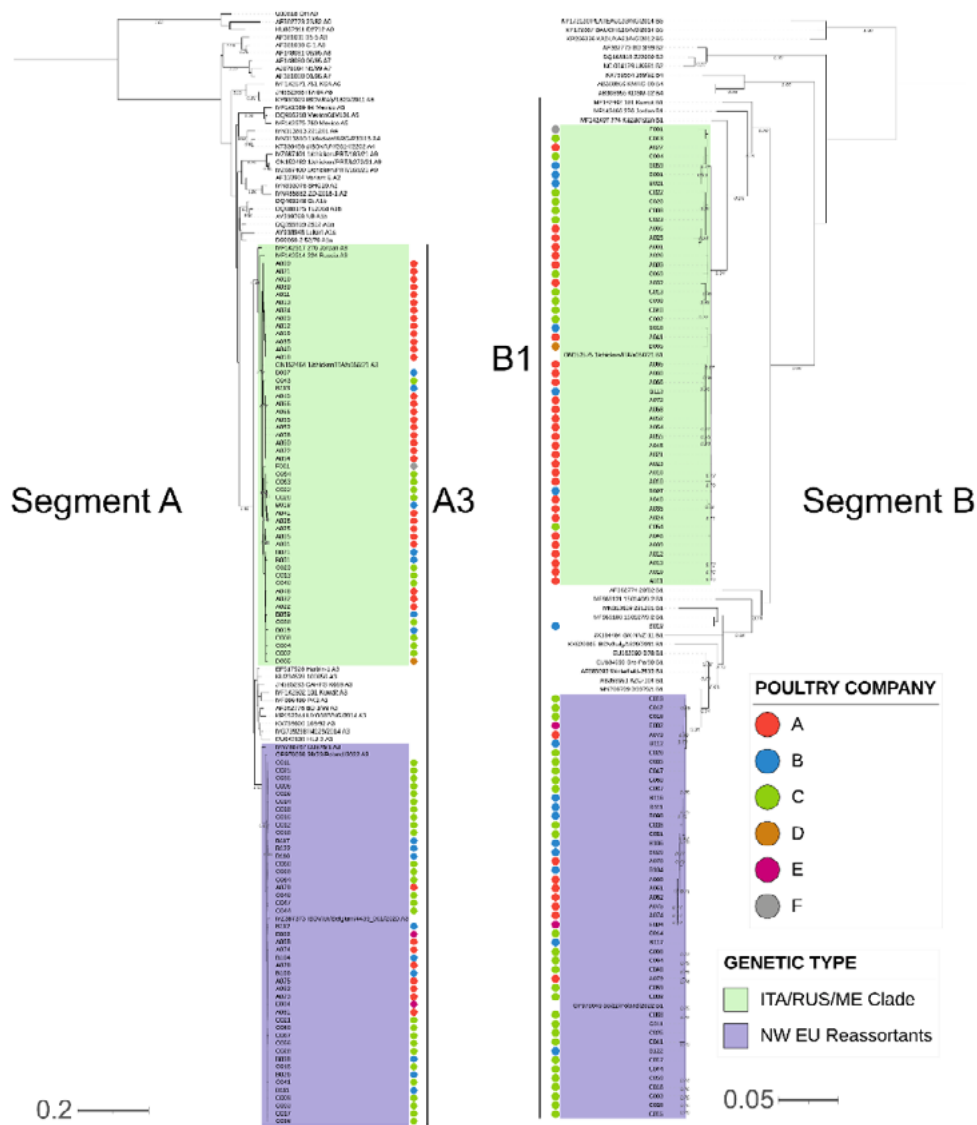
Analisi statistiche

Il test del chi-quadro è stato utilizzato per valutare eventuali differenze nei risultati, classificati come positivi per ceppi di campo o positivi per ceppi vaccinali. L'analisi è stata condotta utilizzando il software R (R Core Team, 2024), impostando il livello di significatività a $P < 0,05$.

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. Dei 256 campioni analizzati, 97 (38%) sono risultati positivi per ceppi di campo, 43 (17%) per ceppi vaccinali e 116 (45%) negativi. Sulla base dell'analisi filogenetica (Figura 1), tutti i ceppi di campo appartenevano al genotipo A3B1 e sono stati suddivisi in due gruppi principali: riassortanti NW EU (47%) e ceppi appartenenti alla clade ITA/RUS/ME (52%). Un singolo campione (B019) ha mostrato caratteristiche discordanti: il gene VP2 risultava compatibile con la clade ITA/RUS/ME, ma la VP1 risultava compatibile con il vaccino a immunocomplessi somministrato, suggerendo una coinfezione o un evento di riassortimento. Il primo rilevamento dei riassortanti NW EU è avvenuto nel dicembre 2023, in Emilia-Romagna, seguito da una rapida diffusione nelle principali regioni avicole italiane, con particolare coinvolgimento del Nord Italia. Questi ceppi si sono diffusi in Emilia-Romagna (12), Lombardia (10), Umbria (1) e soprattutto in Veneto (23). La clade ITA/RUS/ME, invece, è stata rilevata lungo l'intero arco dello studio in Emilia-Romagna (31), Lazio (1), Lombardia (2), Marche (2), Piemonte (1) e Veneto (14) (Figura 2). 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 3).

Figura 1. Alberi filogenetici che mostrano le relazioni tra i virus isolati sul campo e sequenziati, contrassegnati con colori diversi a seconda dell'azienda avicola di provenienza, e sequenze rappresentative dei genograppi del segmento A e del segmento B.



DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine evidenziano un quadro epidemiologico dinamico e in rapida evoluzione, caratterizzato dalla co-circolazione di ceppi appartenenti alla clade ITA/RUS/ME e di ceppi riassortanti NW EU. Il primo rilevamento di questi ultimi è avvenuto nel dicembre 2023, indicando una recente introduzione sul territorio nazionale. Nonostante la nota struttura altamente integrata del settore avicolo italiano, tale evento suggerisce una diffusione virale efficace anche tra realtà produttive differenti, in linea con quanto osservato per altri patogeni (Franzo et al., 2020). Sebbene l'ingresso dei riassortanti NW EU in Italia sia avvenuto più tardivamente rispetto ad altri Paesi europei, questi ceppi hanno mostrato una rapida capacità di diffusione, diventando progressivamente predominanti rispetto ai ceppi autoctoni. Tuttavia, contrariamente a quanto ipotizzato in precedenza, tale sostituzione non sembra essere stata accompagnata da un incremento della pressione infettiva, che è rimasta sostanzialmente stabile nel tempo. Questo dato suggerisce una maggiore fitness epidemiologica dei riassortanti NW EU, in grado di competere efficacemente con i ceppi già circolanti senza determinare un aumento complessivo dell'infezione, come già riportato in altri contesti geografici (Legnardi et al., 2023; Legnardi et al., 2024a). Nonostante ciò, la clade ITA/RUS/ME, presente in Italia da diversi anni, continua a co-circolare negli stessi areali produttivi. Dal punto di vista clinico, entrambe le tipologie di ceppi di campo sembrano essere prevalentemente associate a infezioni subcliniche, come suggerito dalla frequente assenza di segni clinici evidenti negli allevamenti campionati. Questa caratteristica è stata confermata sperimentalmente per i riassortanti NW EU, che risultano comunque in grado di indurre effetti immunosoppressivi rilevanti (Mató et al., 2020). Dal punto di vista diagnostico e gestionale, questi risultati evidenziano diverse criticità. In primo luogo, emerge l'importanza di analizzare entrambi i segmenti genomici (VP2 e VP1) per una corretta caratterizzazione dei ceppi virali e per l'identificazione di eventuali eventi di riassortimento. Inoltre, i dati sottolineano la necessità di adottare programmi di monitoraggio routinario, non limitati ai soli casi con sospetto clinico, al fine di intercettare precocemente la circolazione virale. Infine, anche la strategia vaccinale rappresenta un elemento da considerare nell'interpretazione dei risultati diagnostici. I vaccini vivi e a immunocomplessi, replicando a livello della borsa di Fabrizio, risultano più facilmente rilevabili rispetto ai vaccini vettorizzati, che non dipendono dalla colonizzazione di questo organo (Ramon et al., 2022). Tuttavia, non sono state evidenziate differenze significative in termini di efficacia protettiva nei confronti dei ceppi di campo attualmente circolanti in Italia (Legnardi et al., 2024b).

Figura 2. Distribuzione dei ceppi di campo rilevati a livello provinciale. L'area della mappa principale è evidenziata nel riquadro che mostra la distribuzione della popolazione avicola (espressa in numero di polli per pixel) secondo il dataset Gridded Livestock of the World 4 (GLW4) (Wisser & Cinardi, 2024).

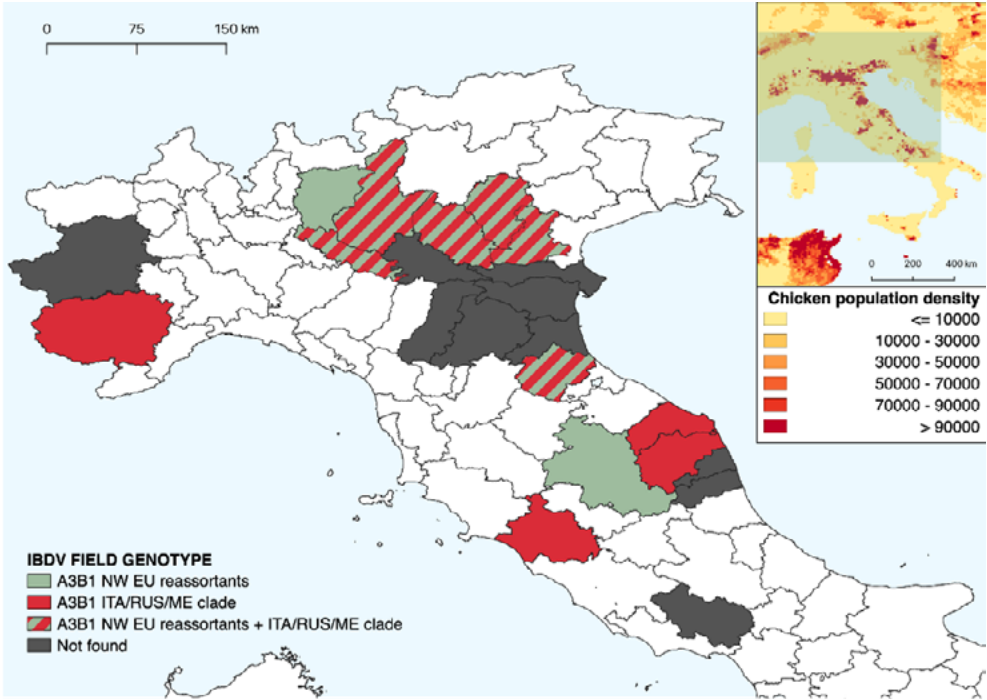
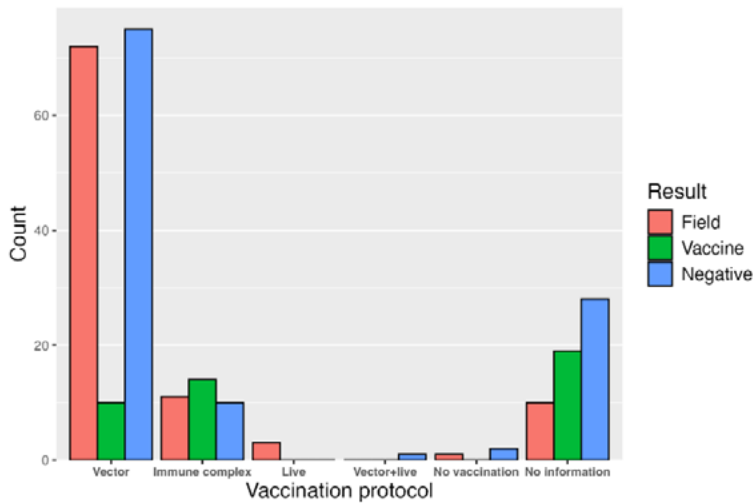


Figura 3. Risultati delle analisi molecolari raggruppati in base al protocollo di vaccinazione somministrato.



CONCLUSIONI

Il presente studio fornisce un quadro aggiornato e dettagliato della situazione epidemiologica di IBDV in Italia, evidenziando il recente ingresso e la rapida diffusione dei ceppi riassortanti NW EU nel comparto del pollo da carne, che risultano attualmente predominanti rispetto ai ceppi precedentemente circolanti. Tuttavia, tale cambiamento non sembra essere associato a un aumento della pressione infettiva complessiva, suggerendo piuttosto un fenomeno di sostituzione competitiva tra ceppi virali. Questi risultati sottolineano l'importanza di adottare strategie diagnostiche e di controllo basate su un monitoraggio molecolare continuo e aggiornato secondo i più recenti criteri di classificazione, al fine di identificare tempestivamente i ceppi circolanti e comprenderne le dinamiche evolutive. Considerati gli effetti immunosoppressivi documentati per questa tipologia di virus, risulta comunque fondamentale rafforzare la sorveglianza sanitaria per valutare il loro impatto su infezioni secondarie, performance produttive e stato sanitario complessivo degli allevamenti. Nel complesso, i dati ottenuti rappresentano un importante strumento sia conoscitivo sia applicativo per migliorare la gestione della malattia, contribuendo ad aumentare la consapevolezza sulle implicazioni dell'immunosoppressione indotta da IBDV, una problematica che rimane tuttora sottostimata a livello nazionale e internazionale.

BIBLIOGRAFIA

1. Cosgrove, A.S. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, 6, 385.
2. Escaffre, O., Le Nouën, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K.M., Guionie, O., Toquin, D., Müller, H., Islam, M.R. & Etteradossi, N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 87, 2767–2780.
3. Etteradossi, N., & Saif, Y. M. (2019). Infectious bursal disease. In *Diseases of Poultry* (14th ed.). Pp. 257-283.
4. Franzo, G., Tucciarone, C. M., Moreno, A., Legnardi, M., Massi, P., Tosi, G., Trogu, T., Ceruti, R., Pesente, P., Ortali, G., Gavazzi, L. & Cecchinato, M. (2020). Phylodynamic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. *Scientific Reports*, 10(1), 7289.
5. He, X., Chen, G., Yang, L., Xuan, J., Long, H., & Wei, P. (2016). Role of naturally occurring genome segment reassortment in the pathogenicity of IBDV field isolates in Three-Yellow chickens. *Avian Pathology*, 45(2), 178–186.
6. Islam, M.R., Rahman, S., Noor, M., Chowdhury, E.H. & Müller, H. (2012). Differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) genome segment B of very virulent and classical lineage by RT-PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Archives of Virology*, 157, 333-336.
7. Islam, M.R., Nooruzzaman, M., Rahman, T., Mumu, T.T., Rahman, M.M., Chowdhury, E.H., Etteradossi, N. & Müller, H. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathology*, 50, 190-206.
8. Jackwood, D.J. & Sommer-Wagner, S.E. (2005). Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emerging Viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49(2), 220–226.
9. Jackwood, D.J. & Sommer-Wagner, S.E. (2007). Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*, 365, 369-375.

10. Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263.
11. Legnardi, M., Franzo, G., Tucciarone, C. M., Koutoulis, K., Duarte, I., Silva, M., Le Tallec, B. & Cecchinato, M. (2022). Detection and molecular characterization of a new genotype of infectious bursal disease virus in Portugal. *Avian Pathology*, 51, 97-105.
12. Legnardi, M., Franzo, G., Tucciarone, C.M., Koutoulis, K. & Cecchinato, M. (2023). Infectious bursal disease virus in Western Europe: The rise of reassortant strains as the dominant field threat. *Avian Pathology*, 52, 25-35.
13. Legnardi, M., Duarte, I., Silva, M.C., Poletto, F., Tucciarone, C.M., Koutoulis, K.C. & Cecchinato, M. (2024a). Epidemiology of infectious bursal disease virus in Portugal: replacement of local strains by Northwestern European reassortants as dominant field type. XVI European Poultry Congress – The Book of Abstracts. (p. 426). Valencia, Spain.
14. Legnardi, M., Poletto, F., Alam, S., Cherfane, A., Le-Tallec, B., Franzo, G., Tucciarone, C. M.; Lupini, C.; Pasotto, D. & M. Cecchinato. (2024b). Molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in the Near East and Persian Gulf regions. *Avian Pathology*, 53, 56-67.
15. Letunic, I. & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Res.* 49 (W1), W293–W296.
16. Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F.A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A.A.M.W., & Mundt, E. (2007). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 81(23), 12827–12835.
17. Mató, T., Tatár-Kis, T., Felföldi, B., Jansson, D. S., Homonnay, Z., Bányai, K., & Palya, V. (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Veterinary microbiology*, 245, 108663.
18. Mató, T., Medveczki, A., & Kiss, I. (2022). Research Note: “Hidden” infectious bursal disease virus infections in Central Europe. *Poultry Science*, 101(8), 101958.
19. Michel, L. O., & Jackwood, D. J. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Archives of virology*, 162(12), 3661–3670. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3500-4>
20. Piśkuła, A., Lisowska, A., & Domańska-Blicharz, K. (2023). Epidemiology of Infectious Bursal Disease Virus in Poland during 2016-2022. *Viruses*, 15(2), 289. <https://doi.org/10.3390/v15020289>
21. R Core Team. (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
22. Ramon, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Cazaban, C., Tucciarone, C.M., Fiorentini, L., Gambi, L., Mato, T., Berto, G., Koutoulis, K. & Franzo, G (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. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 978901.
23. Reddy, V.R., Bianco, C., Poulos, C., Egana-Labrin, S.C., Brodrick, A.J., Nazki, S., Schock, A. and Broadbent, A.J. (2024). Molecular characterization of reassortant infectious bursal disease virus (IBDV) strains of genogroup A3B1 detected in some areas of Britain between 2020 and 2021. *Virology*, 600, 110269.

24. 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. & Qi, X. Identification and Pathogenicity Evaluation of a Novel Reassortant Infectious Bursal Disease Virus (Genotype A2dB3). (2021) *Viruses*, 13, 1682.
25. Wisser, D. & Cinardi, G. (2024). *Gridded livestock of the world 4: gridded livestock density (Global — 2020 — 10 km)*. Rome, Italy: FAO.
26. Zhang, W., Wang, X., Gao, Y. & Qi, X. (2022). The Over-40-Years-Epidemic of Infectious Bursal Disease Virus in China. *Viruses*, 14, 2253.

INDICE DEGLI AUTORI

A

Abdallah A. 45
Alloni M. 65
Andolfatto C. 30, 86, 161, 174
Anfossi P. 151
Antoci F. 23
Averaimo D. 23

B

Bacchin C. 192
Bakhouché B. 61
Bano L. 36, 192
Barbieri I. 54
Barbuto B. 93
Baston R. 30, 174
Benini V. 177
Bertazzo V. 93
Beverelli M. 23
Borrelli L. 102
Bortolami A. 23, 93, 177, 184
Bottinelli M. 93
Bove A. 47
Brandi A. 54
Broggi M. 93, 177
Bukowska P. 42

C

Caceres J.C. 45
Camarda A. 47
Capello K. 128
Carnaccini S. 45
Casalino G. 47
Casiro S. 42
Castellina C. 108
Catania A.M. 108
Catania S. 23, 184
Catelli E. 102, 128, 140, 151, 198
Cattoli G. 128
Cecchinato M. 30, 86, 161, 174, 198
Cesca A. 192
Chabani S. 61

Cirasella L. 54
Circella E. 47
Compri E. 23
Cordioli B. 23
Crovato S. 128
Czarniak P. 42

D

Dall'Angelo A. 93, 177
D'Annunzio G. 23
De Nardi M. 128, 198
Desio G. 23
Dilmi S. 61
Dipineto L. 102
Di Schiavi M.T. 93
Domizio A. 93
Drago A. 177
Drigo I. 36, 192

E

El-Gazzar M. 45
Esposito E. 61

F

Fabbri G. 54
Facchetti G. 115
Felice V. 65
Felici M. 82
Filipe J. 115
Fiorentini L. 23, 54, 184
Fioretti A. 102
Fiorini L. 174
Foiani G. 177
Franzo G. 30, 86, 161, 174, 198
Fusaro A. 93, 177

G

Gadu E. 45
Galante D. 23
Galbusera F. 93, 177
Gallina G. 145

Garbuio M. 36
Gavazzi L. 108
Genovese S. 36
Giaccone V. 198
Giacomelli M. 23, 93, 177, 184
Gibelli L.R. 23
Giovanardi D. 192
Gobbo E. 36
Graziosi G. 102, 198
Grego E. 108
Grilli E. 82
Grilli G. 65, 115
Guolo A. 36

H

Harper V. 174

I

Ioakeimidou M. 108
Ivanova M. 61

L

Leardini S. 177
Legnardi M. 30, 86, 161, 174, 198
Lizzi G. 198
Locatelli E. 65
Lombardi R. 47
Luisetto P. 192
Lupini C. 102, 128, 140, 151, 198

M

Mandola M.L. 23
Marcolin S. 93
Marino A.M.F. 23
Martella L. 128
Merialdi G. 54
Messina D. 47
Mondo E. 61
Morbarigazzi M. 140
Moreno Martin A. 23

Moschioni C. 192
Motta A. 102
Mouw M. 45
Mulatti P. 128

N

Nogarol C. 23

O

Otani S. 61

P

Pace A. 102
Paniccià M. 23
Pasotto D. 174
Pedrazzoli S. 198
Perina A. 177, 184
Perulli S. 23, 54, 184
Pezzotti R. 30
Piersanti F. 23
Pinna L. 23
Pirotta M. 93, 177
Piva A. 82
Piva S. 61
Poletto F. 30, 86, 161, 174, 198
Poluzzi A. 151
Puggioni G. 23

Q

Quaglia G. 140, 198

R

Rapi M.C. 115
Rezouani I. E. 61
Rizzardi A. 36, 192
Rocculi P. 140
Romito D. 47
Rossi F. 23
Russo E. 145

S

Salierno D. 47
Salvaggio A. 23
Santaniello A. 102
Sapio M. 102
Sartore P. 30
Sato Y. 45
Scagliotti P.F. 108
Scaravelli D. 61
Scarpellini R. 61
Scolamacchia F. 128
Siclari C. 54
Simonetto A. 128
Soncin M. 93
Sorice A. 65
Stella M.C. 108

T

Tampieri M.G. 145
Tatino F. 102
Tinti P. 115
Tomasoni R. 102, 151
Tonellato F.R. 161
Tonon E. 192
Tonon S. 23
Tosi G. 54
Trimble L. 45
Tucciarone C.M. 30, 86, 161, 174, 198
Tugnoli B. 82

U

Uboldi O. 115

V

Varelli M.P. 177
Vedana M. 36
Viel L. 36
Volorio A. 145

W

Wang H.Y. 45
Wilson D. 45

Z

Zago M. 128
Zalewska E. 42
Zambon I. 93, 177
Zanardello C. 23, 93, 177, 184
Zandonà L. 36, 192

LET YOUR
VACCINATION PLAN

B R E A T H E

RESPIVAC® aMPV

L'unico vaccino contro l'aMPV che può essere
somministrato 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 1 flaconcino di liofilizzato contenente 10.000 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. 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

For any questions, please contact:

Loredana Flora, Technical Sales Consultant - Livestock, Poultry and Dairy

email: loredana-flora@idexx.com | m. +39 345 3499535

IDEXX Laboratories Italia srl | via Guglielmo Silva 36 | 20149 Milano, Italia | idexx.com

IDEXX



La salute intestinale è la base delle performance

In Kemin aiutiamo il settore avicolo a migliorare la salute intestinale e la robustezza degli animali attraverso soluzioni supportate dalla scienza.

Grazie a strategie nutrizionali preventive, è possibile ridurre l'impatto delle principali sfide enteriche, sostenere le performance produttive e promuovere un uso responsabile dei farmaci.

Perché un intestino sano significa animali più robusti, migliori risultati produttivi e maggiore sostenibilità dell'allevamento.



**Scansiona
e scopri
di più**

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 graphic of a transparent, oval-shaped prism is positioned on the left. A beam of white light enters from the left, passes through the prism, and is refracted into a broad, multi-colored spectrum of light (red, orange, yellow, green, blue, and purple) that fans out towards the right side of the image.

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





MicroSaf

GO TECHNOLOGY

**IL PROBIOTICO PER AVICOLI CON
L'INNOVATIVA GO TECHNOLOGY***



**FASTER
STRONGER**

* Germination Optimisation Technology patents: US 9447 376, 9,932,543 & EP 2,954,041

phileo-lesaffre.com

 **Phileo**
by Lesaffre





UN PASSO AVANTI NELLA PROTEZIONE DELL'ALLEVAMENTO.

RCP



Per l'impostazione del piano vaccinale **consulta sempre il tuo medico veterinario.**

Materiale riservato ai medici veterinari e agli allevatori professionisti.

