



**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**  
SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

## Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2012



## LI Convegno Annuale

Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 Ottobre 2012

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE ATTI del LI Convegno Annuale

In copertina: **“Io e le mie amiche”**, Nicoletta Belletti

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

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2012**

**Salsomaggiore Terme (PR)  
11-12 Ottobre 2012**



## INDICE

Prefazione .....	pag. 19
------------------	---------

### ATTI DEL L CONVEGNO ANNUALE

*Forlì, 8 Aprile 2011*

- *Giampaolo Asdrubali* - INTRODUZIONE ..... pag. 23
- *Daniele Gallazzi* - L'INSEGNAMENTO DELLA PATOLOGIA AVIARE NELLE UNIVERSITA' ITALIANE..... pag. 25
- *Silvio Pascucci* - OSSERVAZIONI SULL'EVOLUZIONE DELLA DIAGNOSTICA VIROLOGICA IN PATOLOGIA AVIARE ..... pag. 28
- *Antonio Zanella* - LA VACCINAZIONE NEL CONTROLLO DELLE MALATTIE INFETTIVE AVIARIE:STORIA ED EVOLUZIONE DELLE STRATEGIE DI INTERVENTO..... pag. 32
- *H. M. Hafez* - POULTRY HEALTH BETWEEN PAST AND FUTURE... pag. 56

### ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA

*Ozzano Emilia (BO), 16 Dicembre 2011*

### RECENTI SVILUPPI SULL' APPLICAZIONE DEI VACCINI DI NUOVA GENERAZIONE IN CAMPO AVIARE

- *Mara Battilani* - VACCINI DI NUOVA GENERAZIONE ..... pag. 63
- *Elena Catelli* - LIMITI DELLE VACCINAZIONI CON VACCINI VIVI TRADIZIONALI: L'ESEMPIO DELLE INFEZIONI DA *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE ..... pag. 75
- *Clive Naylor* - TOWARDS THE DEVELOPMENT OF BETTER AVIAN *METAPNEUMOVIRUS* LIVE VACCINES BY REVERSE GENETICS ..... pag. 85
- *Christophe Cazaban* - VECTOR VACCINES: A BREAKTHROUGH APPROACH TOWARDS BETTER DISEASE PREVENTION ..... pag. 133
- *François Xavier Le Gros* - A VECTOR VACCINE DESIGNED FOR GUMBORO DISEASE CONTROL WORLDWIDE ..... pag. 141

## ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA

*Legnaro (PD), 6 Luglio 2012*

### LA RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI NEL SETTORE AVICOLO

- *Alessandra Piccirillo* - ANTIBIOTICO-RESISTENZA: MECCANISMI E STRATEGIE ..... pag. 151
- *Valeria Bortolaia* - PROBLEMI EMERGENTI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEL SETTORE AVICOLO ..... pag. 161
- *Antonia Ricci* - SORVEGLIANZA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEL SETTORE AVICOLO: L'ATTIVITA' DELL'IZSVe ..... pag. 171
- *Stefano Ferrarini* - IL RUOLO DELLA SANITA' PUBBLICA NELLA SORVEGLIANZA DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA ..... pag. 179
- *Ettore De Canale* - VENETO: ENTEROPATOGENI IN ENTER-NET ..... pag. 187

## ATTI DEL LI CONVEGNO ANNUALE

*Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 Ottobre 2012*

### COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Aiello R., Beato M.S., Rigoni M., Maniero S., Mancin M., Capua I., Terregino C.* IDENTIFICAZIONE DI VIRUS HPAI NELLE PENNE DELLE ANATRE: RILEVANZA DEL METODO DIAGNOSTICO E DELL'ETÀ DEI SOGGETTI CAMPIONATI ..... pag. 199
- *Augustinsky K., Schwefer S., Castello M., Ponsa F.* VACCINAZIONE DI ALLEVAMENTI DI BROILER CON AVIPRO® PRECISE E UN VACCINO GUMBORO DI CEPPO INTERMEDIO (POSTER) ..... pag. 204
- *Bilato D., Ceglie L., Giurisato I., Catelli E., Catania S.* CHLAMYDIA PSITTACI NEL COLOMBO DI CITTÀ: ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI, SIEROLOGICI E BIOMOLECOLARI ..... pag. 207
- *Camarda A., Troiano P., Circella E., Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Petrella A.* FOCOLAIO DI MAL ROSSINO IN UN ALLEVAMENTO DI FAGIANI (POSTER) ..... pag. 212

- *Caroli A., Circella E., Di Paola G., Cafiero M.A., Giangaspero A., Pugliese N., Legretto M., Camarda A.*  
 VARIAZIONE NEL TEMPO DELLA SENSIBILITÀ DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NEI CONFRONTI DI MOLECOLE ACARICIDE UTILIZZATE IN CAMPO ..... **pag. 216**
  
- *Castello M.C.*  
 1992 - 2012 PROBIOSI: STORIA O SFIDA? ..... **pag. 226**
  
- *Catania S., Battanolli G., Baldasso E., Fincato A., Rodio S., Iob L.*  
 ANALISI DEI CEPPI CIRCOLANTI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* MEDIANTE L'UTILIZZO DI METODICHE BIOMOLECOLARI ..... **pag. 234**
  
- *Catania S., Battanolli G., Rodio S., Quattieri K., Baldasso E., Iob L.*  
 APPLICAZIONI DI METODICHE BIOMOLECOLARI PER LA DIFFERENZIAZIONE GENOTIPICA IN *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ..... **pag. 237**
  
- *Catania S., Fincato A., Flaminio B., Santone C., Rodio S., Iob L.*  
*MYCOPLASMA IOWAE* IN TACCHINI DA CARNE: VALUTAZIONI CLINICHE E ANATOMOPATOLOGICHE ..... **pag. 240**
  
- *Catelli E., Lupini C., Listorti V., Marziali A., De Matteo P., Naylor C.J., Cecchinato M.*  
 EVIDENZE SPERIMENTALI DELLA RESISTENZA DEL PICCIONE (*COLUMBA LIVIA*) ALL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* E DELLA SUA IRRILEVANZA NELLA TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE AL TACCHINO ..... **pag. 243**
  
- *Cecchinato M., Morandini E., Listorti V., Lupini C., Pesente P., Giovanardi D., Rossi G., Sperati Ruffoni L., Catelli E.*  
 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* (AMPV) ISOLATO IN CORSO DI FORMA RESPIRATORIA NELLA FARAONA ..... **pag. 251**
  
- *Cecchinato M., Lupini C., Munoz Pogoreltseva O.S., Listorti V., Mondin A., Catelli E.*  
 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI E LA QUANTIFICAZIONE DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* SOTTOTIPO A E B ..... **pag. 257**
  
- *Cesari V., Toschi I., Giardini A., Ferrazzi V., Gallazzi D.*  
 VALUTAZIONI PRELIMINARI DI UNA MISCELA DI *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SULLE PERFORMANCE DELLA GALLINA OVAIOLE E SULLA QUALITÀ DELL'UOVO ..... **pag. 264**

- *Circella E., Legretto M., Pugliese N., Bozzo G., Caroli A., Camarda A.*  
DAL PAPPAGALLO AL DIAMANTE DI GOULD: UN NUOVO OSPITE PER  
BFDV (*BEAK AND FEATHER DISEASE VIRUS*) ..... **pag. 267**
  
- *Dardi M., De Gussem M., Van Mullem K., Van Meirhaeghe H., Vandebussche N.,  
Pagès M., Rubio J.*  
VALUTAZIONE ZOO-ECONOMICA DELL'USO DI UN VACCINO VIVO  
ANTICOCCIDICO IN ROTAZIONE AI COCCIDIOSTATICI NEI POLLI  
DA CARNE: RISULTATI DI UNA SERIE DI PROVE DI CAMPO IN BELGIO  
E IN OLANDA (**POSTER**) ..... **pag. 276**
  
- *Falchieri M., Lupini C., Cecchinato M., Listorti V., Catelli E., Kontolaimou M.,  
Naylor C.J.*  
IMPIEGO DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* (AMPV) COME POSSIBILE  
VACCINO VIVO RICOMBINANTE PER L'ESPRESSIONE DI  
PROTEINE IMMUNOGENE DEL CORONAVIRUS DELLA BRONCHITE  
INFETTIVA ..... **pag. 278**
  
- *Fiorentini L., Lilliu E., Tosi G., Taddei R., Lontani B., Gaspari P., Massi P.*  
PREVALENZA DEI PORTATORI ASINTOMATICI DI *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* NEI POLLI REGOLARMENTE MACELLATI,  
VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DEI CEPPI ISOLATI:  
RISULTATI PRELIMINARI ..... **pag. 284**
  
- *Flaminio B., Gobbo F., Quattieri K., Sturaro A., Battanolli G., Catania S.*  
STUDIO DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) IN  
CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ISOLATI DURANTE IL  
TRIENNIO 2010-2012 ..... **pag. 293**
  
- *Gobbo F., Flaminio B., Fincato A., Baldasso E., Santone C., Catania S.*  
*MYCOPLASMA SYNOVIAE* E CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE  
(MIC): VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO SUSCETTIBILITÀ IN FUNZIONE  
DELLA CATEGORIA PRODUTTIVA E DEL GENOTIPO (VLHA) ..... **pag. 297**
  
- *Guarneri P., Zuccarello S., Gallazzi D., Grilli G.*  
CONFRONTO FRA DIVERSE TIPOLOGIE DI ALLEVAMENTO DELLA  
GALLINA OVAIOLA COMMERCIALE ..... **pag. 303**
  
- *Legretto M., Circella E., Caroli A., Pugliese N., Meliota F., Lozito P., Camarda A.*  
INNOCUITÀ ED EFFICACIA PROTETTIVA DEL CEPPO ATTENUATO  
*SALMONELLA GALLINARUM* SGP695AV NEL POLLO ..... **pag. 314**



- *Menna L.F., Santaniello A., Borrelli L., Russo T.P., Fontanella M., Di Maggio A., Dipineto L., Fioretti A.*  
 ATTIVITÀ ASSISTITE CON GLI ANIMALI E SALUTE PUBBLICA:  
 MONITORAGGIO SANITARIO CONDOTTO NELL'AREA VERDE DI UN  
 OSPEDALE PSICHIATRICO GIUDIZIARIO IN CAMPANIA  
**(POSTER)** ..... **pag. 325**
  
- *Taddei R., Tosi G., Boniotti M.B., Casadio M., Fiorentini L., Fabbi M., Massi P.*  
 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA  
 BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA TRA IL 1963 ED  
 IL 1989 ..... **pag. 332**
  
- *Taddei R., Tosi G., Barbieri I., Casadio M., Fiorentini L., Massi P.*  
 TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTI-*  
*CUM* CIRCOLANTI IN ITALIA TRA IL 2010 ED IL 2012 ..... **pag. 342**
  
- *Toffan A., Bonci M., Bano L., Valastro V., Vascellari M., Capua I., Terregino C.*  
 DESCRIZIONE DI FOCOLAI DI BRONCHITE INFETTIVA SOSTENUTA  
 DAL CEPPQ1 RECENTEMENTE SEGNALATO IN ITALIA ..... **pag. 350**
  
- INDICE DEGLI AUTORI** ..... **pag. 355**

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2012 sono realizzate grazie al contributo di:

- AVIAGEN ITALIA
- BAYER SANITÀ ANIMALE
- CEVA SALUTE ANIMALE
- CHEMIFARMA
- COBB
- DOX AL ITALIA
- ELANCO ANIMAL HEALTH
- FATRO
- HIPRA
- HUVEPHARMA
- IZO
- LOHMANN ANIMAL HEALTH
- MERIAL ITALIA
- MSD ANIMAL HEALTH
- NOVARTIS ANIMAL HEALTH
- PFIZER ITALIA
- TRE I



## PREFAZIONE

L'avicoltura è, tra i comparti zootecnici mondiali, in continua espansione. Tutto ciò è avvenuto grazie ai miglioramenti genetici, alle nuove tecniche di allevamento e di nutrizione, allo sviluppo e applicazione della biosicurezza ed al miglioramento della salute degli animali.

La salute animale si mantiene, oltre che rispettando le norme di biosicurezza, anche grazie all'uso consolidato di vaccini. Queste pratiche, comunque, non sono sempre sufficienti a garantire completamente la salute animale e, quando occorre, si ricorre ad interventi terapeutici mirati. Le terapie, come noto, sono eseguite spesso con principi attivi antimicrobici che sono preziosi strumenti per tutelare la salute ed il benessere degli animali. Il loro utilizzo non deve però prescindere da valutazioni riguardanti l'instaurarsi di fenomeni di resistenza che possono ridurne così l'efficacia.

L'utilizzo degli antimicrobici e le modalità del loro impiego rappresentano, quindi, un aspetto delicato ed importante nella gestione degli animali d'allevamento, avicoli compresi. Infatti, nei Paesi industrializzati, la quantità di antimicrobici destinata all'uso nel settore veterinario e zootecnico è solo di poco inferiore a quella destinata ad uso umano. Molti tra gli antibiotici utilizzati, appartengono a classi di molecole usate anche in medicina umana e possono presentare fenomeni di resistenza crociata con queste.

La Società Italiana di Patologia Aviare, sempre attenta a quelle che sono le esigenze di informare con rigore scientifico tutti i soci, quest'anno ha intrapreso un percorso congressuale volto a mettere in evidenza i vari aspetti legati all'utilizzo del farmaco antinfettivo in avicoltura. Il primo incontro, che si è tenuto a Padova il 6 luglio, ha avuto come titolo "La resistenza agli antimicrobici nel settore avicolo" ed ha riscontrato notevole interesse e partecipazione, oltre che da parte dei soci, anche di operatori del settore veterinario pubblico che si sono interessati, solo di recente, alle attività della nostra Società Scientifica. Il secondo incontro, che occuperà la parte centrale del 51° Congresso, sarà incentrato sull'uso responsabile degli antimicrobici in avicoltura, argomento di estrema attualità. In ambedue gli incontri le relazioni sono presentate da ricercatori internazionali e nazionali, di alto profilo scientifico e con specifica preparazione della materia, garanzia di una comunicazione scientifica attuale ed approfondita.

Il 51° Convegno Nazionale sarà tenuto a Salsomaggiore Terme (PR), uscendo un po' da quella che era la tradizione consolidata che vedeva i nostri incontri annuali presso la Fiera di Forlì. Questo non vuol dire che ci siamo dimenticati di chi ci è stato di supporto nell'organizzazione dei precedenti convegni, cioè la CCIAA di Forlì e Cesena e la Fiera di Forlì, ma è solo un cambiamento legato alla cadenza ormai biennale della Fiera Internazionale dell'Avicoltura e che quest'anno non viene organizzata.

*Dott. Guido Grilli*  
*Presidente SIPA*



**LI CONVEGNO ANNUALE**

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 Ottobre 2012



## **IDENTIFICAZIONE DI VIRUS HPAI NELLE PENNE DELLE ANATRE: RILEVANZA DEL METODO DIAGNOSTICO E DELL'ETÀ DEI SOGGETTI CAMPIONATI**

Aiello R., Beato M.S., Rigoni M., Maniero S., Mancin M., Capua I., Terregino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale, OIE/FAO per l'Influenza Aviaria e la Malattia di Newcastle, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (Padova)*

### **Summary**

Previous studies have reported the detection of HPAI H5N1 virus in feathers from naturally and experimentally-infected ducks; however, knowledge on the relevance of age on virus detection in feathers from asymptomatic ducks is lacking and would be important for development of effective surveillance strategies. In this study, young (4-weeks) and adult (24-weeks) Pekin ducks (*Anas platyrhynchos domestica*) were inoculated with a clade 2.2 field isolate of HPAI H5N1 virus (*A/duck/Nigeria/1071-23/2007*). Tracheal (Tr) and cloacal (Cl) swabs and feathers from the wing, breast, and tail regions were collected at 3, 5, 7 and 10-days-post infection and tested for presence of virus by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RRT-PCR) and an *ad hoc double* antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). Virus was detected by RRT-PCR for a longer period of time in feathers (10 days) than in Tr and Cl swabs (7 days) in young ducks, but not in adult ducks. DAS-ELISA proved to be suitable for virus detection in feathers during the early stages of infection (days 3 and 5 p.i.) in young ducks only. An age-related presence of virus in duck feathers was observed, together with an age-related susceptibility to H5N1 HPAI infection. The probability to detect virus-positive feathers and/or Tr swabs was greater in young ducks ( $P < 0.01$ ) than in adult ducks ( $P > 0.10$ ), with major differences during the early stages of infection. Our study shows that feathers may represent a valid diagnostic sample in suspected HPAI outbreaks and in surveillance programs, particularly when collected from young ducks. The use of an *ad hoc* immunoassay may be useful to detect HPAI when molecular techniques and/or virus isolation procedures are not available.

### **INTRODUZIONE**

Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo dei volatili acquatici selvatici e domestici nel mantenimento e nella diffusione delle infezioni da virus influenzali. In particolare nelle anatre domestiche anche l'infezione con virus ad alta patogenicità (HPAI) può risultare asintomatica e per tale ragione la rapida identificazione del virus in animali apparentemente sani è fondamentale per le strategie di controllo.

La scoperta della colonizzazione virale precoce dei follicoli delle penne sia a seguito di infezione sperimentale che naturale con virus HPAI (Perkins & Swayne 2001, Busquets 2010, Yamamoto 2007, Yamamoto 2008) ha posto in evidenza il possibile uso delle penne come campione diagnostico. Inoltre, è stato dimostrato che le penne risultano positive per un periodo di tempo più prolungato rispetto ai campioni convenzionali (tamponi e organi). Tuttavia non esiste uno studio sulla colonizzazione delle penne in anatre asintomatiche di diverse età.



Lo scopo del nostro studio è stato quindi la valutazione della colonizzazione virale delle penne mediante due diverse metodiche (ELISA e RRT-PCR) da parte di un virus HPAI appartenente al clade 2.2 in anatre giovani e adulte sperimentalmente infette. Penne e tamponi tracheali e cloacali sono stati prelevati a diversi intervalli di tempo. I risultati sono stati analizzati per valutare l'efficacia del metodo ELISA *ad hoc* sviluppato, e la validità delle penne come campione diagnostico rispetto ai campioni convenzionali.

I dati presentati forniscono ulteriore evidenza della validità delle penne come campione diagnostico, anche in animali asintomatici, e forniscono indicazioni utili relative all'età degli animali da sottoporre a campionamento durante le attività di sorveglianza.

## **MATERIALI E METODI**

### *Disegno sperimentale*

Sedici anatre di 4 settimane di età (giovani) sono state infettate per via oronasale con 100 µl di liquido allantoideo contenente 107 EID<sub>50</sub>/0,1 ml del ceppo H5N1 HPAI A/duck/Nigeria/1071-23/2007 (clade 2.2), letale per il pollo, isolato in Nigeria da anatre domestiche apparentemente sane.

L'eventuale insorgenza di sintomatologia clinica è stata monitorata due volte al giorno e tamponi tracheali e cloacali e penne in fase di sviluppo (ben vascolarizzate) da tre regioni del corpo (ala, petto, coda) sono state prelevate nei giorni 3, 5, 7 e 10 post infezione (p.i.). Campioni ematici sono stati prelevati prima dell'infezione e al giorno 10 p.i., per esami sierologici (test ELISA commerciale competitivo e test di inibizione dell'emoagglutinazione). Inoltre, tre animali sono stati selezionati in modo casuale e soppressi nei giorni 3 e 5 p.i. per valutare la colonizzazione virale di organi e tessuti. Per tale ragione la numerosità campionaria è diminuita nel tempo.

Lo stesso disegno sperimentale è stato applicato ad un gruppo di sedici anatre di 24 settimane di età (adulte), infettate con lo stesso virus, dose e via di infezione.

### *Identificazione virale*

I tamponi tracheali e cloacali e le penne sono stati analizzati mediante RRT-PCR (Spackman 2002), selezionata come metodica *gold standard*, essendo un test rapido, sensibile e validato per l'identificazione dei virus influenzali.

Un test immunoenzimatico (ELISA *sandwich*) *ad hoc* è stato sviluppato per tale ricerca sulla base di una metodica già pubblicata (Lee *et al.* 1993), utilizzando due anticorpi monoclonali commerciali. Prima di essere applicato alle penne, il test ELISA *sandwich* è stato validato utilizzando matrici virali convenzionali a diverse diluizioni.

### *Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata effettuata mediante curve ROC (Thrusfield 2005) per determinare il valore *cut-off* dell'ELISA *sandwich* e per valutarne sensibilità e spe-

cificità rispetto alla RRT-PCR (gold standard). Per valutare l'eventuale differenza tra le tre diverse regioni di prelievo delle penne l'analisi ANOVA per misure ripetute (West 2007) è stata applicata. Inoltre, i risultati ottenuti dalle penne sono stati comparati con i risultati ottenuti dai tamponi mediante test esatto di Mc Nemar ad una coda per dati appaiati (Thrusfield 2005) e eventuali differenze nella positività dei campioni tra anatre giovani e adulte sono state valutate mediante un modello Logit per misure ripetute (Littel 2002).

## **RISULTATI**

### *Segni clinici e mortalità*

Due delle sedici anatre giovani infette hanno manifestato segni clinici lievi e non specifici (depressione e lieve congiuntivite) dal giorno 2 p.i. e sono morte il giorno 4 p.i.. Una delle sedici anatre adulte infette ha manifestato lieve depressione dal giorno 5 p.i. ed è morta il giorno 6 p.i.. Nessuno degli altri soggetti ha manifestato evidente sintomatologia clinica.

### *Sierologia*

Tutti i sieri prelevati prima dell'infezione sono risultati negativi mediante ELISA commerciale per virus influenzali di tipo A e test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) per il sottotipo H5. Dei soggetti sopravvissuti all'infezione, 6/8 anatre giovani e 6/9 anatre adulte sono risultate positive mediante test HI.

### *Analisi dei campioni mediante RRT-PCR e ELISA sandwich*

Positività elevata è stata riscontrata nei tamponi tracheali prelevati dalle anatre giovani nei giorni 3 e 5 p.i.. Solo alcuni tamponi tracheali sono risultati positivi il giorno 7 p.i. e nessuno il giorno 10 p.i. Una positività inferiore è stata riscontrata nei tamponi cloacali, risultati negativi il giorno 10 p.i. (Tabella 1).

Nelle anatre adulte la positività dei tamponi tracheali e cloacali è stata complessivamente inferiore rispetto a quella delle anatre giovani (Tabella 1).

Nelle anatre giovani una positività elevata è stata riscontrata tramite RRT-PCR e ELISA *sandwich* nelle penne prelevate nei giorni 3 e 5 p.i., mentre nei giorni 7 e 10 p.i. le penne sono risultate positive solo tramite RRT-PCR. Nelle anatre adulte un numero ridotto di campioni di penne è risultato positivo nei giorni 3 e 5 p.i. rispetto alle giovani (Tabella 1).

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nelle tre zone di campionamento delle penne.

Confrontando i risultati ottenuti tramite RRT-PCR dai tamponi e dalle penne prelevati dalle anatre giovani, le penne sono risultate positive per un periodo di tempo prolungato rispetto ai tamponi ed hanno consentito di individuare l'infezione in un maggior numero di animali rispetto ai tamponi. La probabilità di trovare un animale positivo tramite tamponi e/o penne è stata sempre maggiore nelle anatre giovani ( $P < 0.01$ ). Nelle anatre adulte non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra penne e tamponi.

**Tabella 1. Risultati della RRT-PCR e dell'ELISAsu tamponi e penne (\*)**

a) Anatre giovani

Gg.p.i.	RRT-PCR TT	RRT-PCR TC	Penne (RRT-PCR)			Penne (ELISA sandwich)		
			ala	petto	coda	ala	petto	coda
3	16/16	7/16	14/16	15/16	16/16	12/16	13/16	13/16
5	9/11	2/11	10/11	10/11	9/11	4/11	5/11	6/11
7	2/8	2/8	8/8	6/8	7/8	0/8	0/8	0/8
10	0/8	0/8	3/8	5/8	7/8	0/8	0/8	0/8

b) Anatre adulte

Gg.p.i.	RRT-PCR TT	RRT-PCR TC	Penne (RRT-PCR)			Penne (ELISA sandwich)		
			ala	petto	coda	ala	petto	coda
3	11/16	4/16	6/16	5/16	5/16	2/16	2/16	1/16
5	4/13	2/13	5/13	3/13	5/13	3/13	0/13	1/13
7	1/9	0/9	3/9	2/9	3/9	1/9	0/9	0/9
10	0/9	1/9	2/9	2/9	2/9	1/9	0/9	0/9

(\*) numero di campioni positivi/totale; Gg.p.i. = giorni post infezione; RRT-PCR = real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction; TT = tamponi tracheali; TC = tamponi cloacali.

## DISCUSSIONE

Il presente studio ha confermato che la suscettibilità delle anatre domestiche all'infezione con virus H5N1 HPAI varia con l'età (Pantin-Jackwood 2007, Löndt 2010), e ha dimostrato che nelle anatre giovani la colonizzazione virale dei follicoli delle penne è maggiore rispetto alle anatre adulte.

Nonostante la RRT-PCR si sia chiaramente dimostrata il test diagnostico più sensibile, l'ELISA ad hoc sviluppato potrebbe essere utile per l'individuazione dei virus HPAI nelle penne negli stadi precoci dell'infezione (fino al giorno 5 p.i.), soprattutto in paesi in cui per ragioni economiche e tecniche la RRT-PCR risulta inapplicabile. Ciononostante, l'applicazione dell'ELISA richiede un'accurata valutazione statistica della numerosità campionaria, ed una validazione specifica per ogni specie avicola.

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra le diverse regioni corporee campionate, sebbene una variabilità tra soggetti sia stata evidenziata, sottolineando l'importanza di una accurata valutazione statistica della numerosità campionaria ai fini del prelievo delle penne.

## CONCLUSIONI

Le penne potrebbero rappresentare un valido campione diagnostico per la rapida identificazione di virus HPAI, anche in soggetti asintomatici. I dati ottenuti in questo studio potranno essere utilizzati per la creazione di strategie di sorveglianza innovative, soprattutto in paesi in cui i virus HPAI risultano endemici.

## BIBLIOGRAFIA

Busquets N, Abad FX, Alba A, Dolz R, Allepuz A, Rivas R, Ramis A, Darji A, Majó N. (2010). Persistence of highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in infected chickens: feather as a suitable sample for diagnosis. *Journal of General Virology*, 91, 2307-2313.

Lee BW, Bey RF, Baarsch MJ, Simonson RR. ELISA method for detection of influenza A infection in swine. *J Vet Diagn Invest*. 1993 Oct;5(4):510-5.

SAS for Linear models, fourth edition; Ramon C. Littell, Walter W. Stroup, Rudolf J. Freund; 2002 by SAS institute Inc., Cary, NC, USA

Löndt BZ, Núñez A, Banks J, Alexander DJ, Russell C, Richard-Löndt AC, Brown IH. The effect of age on the pathogenesis of a highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) infected experimentally. *Influenza Other Respi Viruses*. 2010 Jan;4(1):17-25.

Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL, Spackman E, Swayne DE. Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. *Virus Res*. 2007 Dec;130(1-2):151-61.

Perkins LE, Swayne DE. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol*. 2001 Mar;38(2):149-64.

Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T. & Suarez, D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3256-3260.

*Veterinary Epidemiology* third edition; Michael Thrusfield; 2005 by Blackwell Science Ltd.

*Linear Mixed Models: a practical guide using statistical software*; Brady T. West, Kathleen B. Welch, Andrzej T. Galecki ; 2007 by Taylor&Francis Group, LLC

Yamamoto Y, Nakamura K, Kitagawa K, Ikenaga N, Yamada M, Mase M, Narita M. Severe nonpurulent encephalitis with mortality and feather lesions in call ducks (*Anas platyrhynchos* var. *domestica*) inoculated intravenously with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Dis*. 2007 Mar;51(1):52-7.

Yamamoto Y, Nakamura K, Okamatsu M, Miyazaki A, Yamada M, Mase M. Detecting avian influenza virus (H5N1) in domestic duck feathers. *Emerg Infect Dis*. 2008 Oct;14(10):1671-2.

## VACCINAZIONE DI ALLEVAMENTI DI BROILER CON AVIPRO® PRECISE E UN VACCINO GUMBORO DI CEppo INTERMEDIO

Augustinsky K., Schwefer S., Castells M. and Ponsa F.

*Lohmann Animal Health GmbH, Heinz-Lohmann-Str. 4, 27472 Cuxhaven, Germany*

### INTRODUZIONE

Il virus IBD (Infectious Bursal Disease virus) di solito è la causa di una malattia altamente contagiosa e immunosoppressiva nei polli. IBD o malattia di Gumboro ha un impatto significativo sulla salute e le prestazioni di allevamenti di polli commerciali, da cui la vaccinazione con vaccini vivi o inattivati che viene eseguita regolarmente. Questo lavoro ha studiato la risposta sierologica e i dati relativi alle prestazioni zootecniche di gruppi di broiler vaccinati con AviPro® Precise (ceppo LC75) ed un prodotto concorrente (ceppo S-706).



### MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato presso due allevamenti di polli da carne nel Regno Unito, denominati Farm A (Cap. 1 e 2) e Farm B (Cap. 4 e 5), in due cicli di produzione consecutivi (Tabella 1).

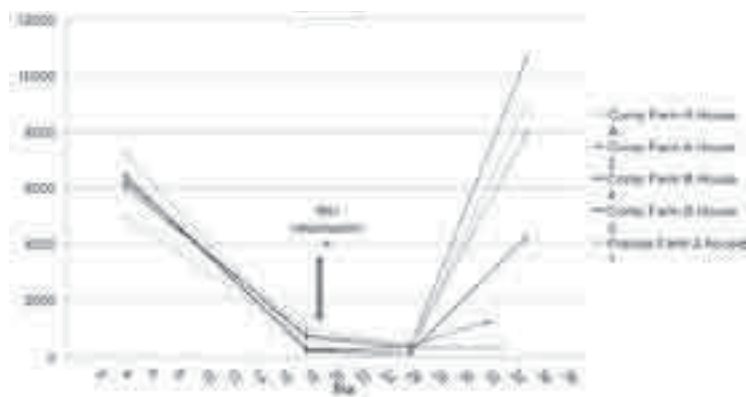
Gli animali sono stati vaccinati il giorno 19° di vita con una singola dose di AviPro® Precise (ceppo LC75) o il vaccino controllo (ceppo S-706) attraverso l'acqua di bevanda. Il momento della vaccinazione è stato fissato indipendentemente dal livello specifico di anticorpi di origine materna (MDA) a quell'età.

I campioni di siero sono stati testati con

Tab. 1: schema della prova

FARM A			
PROGRAMMA VACCINALE	CICLO	CAP	No. BROILERS (ma)
Controllo	1	1	44.700
Controllo	1	2	44.650
AviPro® Precise	2	1	43.650
AviPro® Precise	2	2	43.650
FARM B			
PROGRAMMA VACCINALE	CICLO	CAP	No. BROILERS (ma)
AviPro® Precise	1	4	22.800
AviPro® Precise	1	5	22.800
Controllo	2	4	22.800
Controllo	2	5	22.800

Grafico 1: titoli IBD ELISA



BioChek kit ELISA per la presenza di anticorpi IBD. I campionamenti in tutti i gruppi della prova sono stati effettuati a 4 giorni, 18 giorni e 26 giorni di età. L'ultimo prelievo di sangue è stato effettuato tra i 32 giorni e i 35 giorni (fine ciclo - età di macellazione).

## RISULTATI

In generale, nella maggior parte dei gruppi vaccinati si è evidenziato un aumento significativo dei titoli IBD dopo la vaccinazione (grafico 1). I titoli IBD dei gruppi vaccinati con AviPro® Precise erano comparabili ai titoli dei gruppi vaccinati con il prodotto in comparazione (controllo) sino al giorno 26° di vita. Nella maggior parte dei gruppi vaccinati con AviPro® Precise si è evidenziato un CV basso e titoli più elevati all'età di macellazione, indice una buona uniformità e quindi di una buona ed omogenea copertura anticorpale nel caso di una eventuale infezione campo. Inoltre è notevole il fatto, che AviPro® Precise ha indotto una elevata produzione di anticorpi anche in presenza di anticorpi materni al di sopra del titolo considerato limite per una risposta. In particolare, nel primo ciclo di Farm B, dove i titoli ELISA medi al momento della vaccinazione erano 585 per Cap. 4 e 988 per Cap. 5, i risultati ELISA a 35 giorni erano rispettivamente 8980 e 7844 rispettivamente, indicando quindi una forte risposta sierologica. In relazione alla performance produttive, i gruppi vaccinati con AviPro® Precise hanno manifestato una più bassa mortalità e altrettanto basso indice di conversione alimentare (FCR), più alto incremento ponderale giornaliero, peso medio alla macellazione ed fattore

Tab. 2: risultati zootecnici

DATI ZOOTECNICI	FARM A		FARM B	
	CONTROLLI	PRECISE	CONTROLLI	PRECISE
Mortalità %	1,1	3,7	1,1	2,9
Incremento ponderale g	11,81	15,28	14,74	17,71
Peso medio alla macellazione Kg	1,75	2,08	2,01	2,14
FCR	1,41	1,43	1,45	1,42
SPD	37	37	118	120

europeo di efficienza di produzione (EPEF) rispetto al prodotto in comparazione (controllo), (Tabella 2).

## **CONCLUSIONI**

Il confronto diretto di due cicli di polli da carne vaccinati con una dose di AviPro® Precise (ceppo LC75) o un prodotto concorrente (ceppo S-706) in condizioni di campo hanno mostrato risultati migliori in termini di mortalità, FCR, incremento ponderale giornaliero, media EPEF e peso medio per i gruppi vaccinati con AviPro® Precise. La risposta sierologica in allevamenti vaccinati con AviPro® Precise a fine del ciclo ha mostrato titoli anticorpali alti e uniformi, dimostrando quindi una buona risposta sierologica alla vaccinazione.

## **CHLAMYDIA PSITTACI NEL COLOMBO DI CITTÀ: ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI, SIEROLOGICI E BIOMOLECOLARI**

°Bilato D., \*Ceglie L., \*Giurisato I., §Catelli E., \*Catania S.

°*Medico Veterinario (Padova)*

\**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (Padova)*

§*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Ozzano Emilia (Bologna)*

### **Summary**

In this study we evaluate the prevalence of *Chlamydiaceae*, especially *C. psittaci*, in synanthropic birds such as urban pigeons in some areas of Venice. Innovative molecular tools, such as microarray and MLVA (*Multilocus VNTR Assay*), were applied in order to evaluate the genotypes of *C. psittaci* and the other species of *Chlamydia* present in this avian population to assess the risk of zoonosis posed by pigeons in this urban area. Moreover, we classified and correlated the gross pathological lesions with the pathogen. Our results showed the presence of *C. psittaci* in urban population of pigeons in Venice, with a prevalence of 10%. We also demonstrated an atypical strain of *C. psittaci* not yet classified with the available laboratory techniques. Genotyping revealed the presence of genotypes B, E and E/B that could be considered less frequently involved in cases of human infection. Additionally, we found other *Chlamydia* strains suggesting the presence of a new *Chlamydia* genotype. Finally, the elaboration of the data, collected during the first and second sampling phase, revealed a correlation between *C. psittaci* and adult females pigeons, presenting hepatomegaly. Based on this results we develop and adopted a diagnostic protocol during necropsy that allows to select pigeons, which have a higher probability to be infected, and a better organization and management of interests samples, containing the economic costs and maintaining high-level of the diagnostic standards.

### **INTRODUZIONE**

Le *Chlamydiae* appartengono all'ordine *Chlamydiales* e alla famiglia *Chlamydiaceae* (1). *Chlamydia spp.* è stata segnalata in 469 specie aviarie appartenenti a 30 ordini di uccelli, principalmente psittaciformi, columbiformi e passeriformi (2).

Il ruolo zoonosico di *C. psittaci* è ampiamente dimostrato, anche se risulta difficile correlare l'infezione in uccelli sinantropi, come il colombo di città, con un reale rischio per l'uomo. Spesso la sola identificazione di specie, all'interno del genere *Chlamydia*, non è sufficiente e sono richieste informazioni aggiuntive che possono caratterizzare ulteriormente questo patogeno, quali per esempio il sierotipo e genotipo. Nuove tecnologie, come il *microarray*, permettono di identificare per *C. psittaci* 9 genotipi, 7 aviarie (A, B, C, D, E, F, E/B) 2 non aviarie (WC, M56), ciascuno associato prevalentemente ad un ordine di uccelli e con diverso rischio zoonosico (3). Altre metodiche, come l'MLVA (*Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis*) permettono di distinguere 20 diversi *patterns* (4).

Inoltre, dato che sia i segni clinici che le lesioni anatomico-patologiche non sono patognomonici e considerato lo stato di portatore asintomatico tipico delle specie aviarie, spesso è difficile avanzare un forte sospetto attraverso un esame clinico



o anatomico-patologico a causa delle scarse correlazioni tra sintomatologia ed eventuali lesioni anatomico-patologiche con l'infezione. Questa carenza pregiudica notevolmente l'esame autoptico quale strumento di *screening* preliminare, volto alla selezione di campioni potenzialmente infetti. Nel presente lavoro abbiamo valutato la prevalenza di *Chlamydiaceae*, ed in particolare *C. psittaci*, in una popolazione aviaria con caratteristiche sinantropiche quale il colombo di città (*Columba livia var. domestica*) nell'areale veneziano. Contestualmente le clamidie isolate sono state caratterizzate valutandone i genotipi mediante tecnologie biomolecolari innovative. Inoltre, si è proceduto ad una classificazione delle lesioni anatomico-patologiche e ad una loro correlazione con la presenza del patogeno.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Il gruppo di animali oggetto di campionamento è stato rappresentato da specie aviarie sinantropiche, ovvero colombi di città (*Columba livia var. domestica*), provenienti da differenti aree della città storica di Venezia e Mestre. I prelievi sono stati eseguiti inizialmente su 439 colombi ed in una seconda fase su 100.

Il protocollo di prelievo ha previsto la strutturazione di schede di rilevamento e rilievo autoptico per singolo soggetto in cui venivano raccolti una serie di parametri utili durante l'esecuzione degli esami necroscopici e per la catalogazione delle lesioni evidenziate.

Da ogni soggetto è stato comunque preventivamente prelevato un campione ematico per effettuare uno *screening* sierologico per *C. psittaci* mediante Fissazione Del Complemento utilizzando un antigene commerciale, secondo protocollo del Manuale OIE (5).

Prima di procedere all'esame autoptico, veniva effettuato in sterilità il prelievo degli organi interessati nello studio, fegato e milza, per evitare eventuali contaminazioni degli stessi, previa compilazione della scheda di rilevamento. In tali schede è stato quindi valutato lo stato sanitario generale dei soggetti, ed in particolare l'età, sviluppo delle masse muscolari, stato del piumaggio, presenza di ecto/endoparassiti, e rilievo di lesioni anatomico-patologiche a carico di fegato, milza, apparato respiratorio e gastroenterico, con il fine di focalizzare la nostra attenzione solamente a quei soggetti presentanti determinate lesioni ascrivibili con maggiore probabilità alla positività per clamidia. Tutte le informazioni sono state raccolte secondo una scala di *grading* che variava da A a D, in cui con il livello A si intendeva la forma fisiologica o l'assenza di parassiti e con livello D una evidente alterazione patologica o una grave infestazione parassitaria.

### *Isolamento e identificazione*

L'iter diagnostico ha previsto una analisi preliminare di *screening*, mediante RFLP-PCR, da organi *target* quali fegato e milza. Gli organi risultati positivi venivano processati con metodiche di isolamento tradizionale in uova embrionate di pollo SPF, ed in linee cellulari continue LLC-MK2. I ceppi isolati sono stati sottoposti a genotipizzazione mediante DNA *microarray Array Tube*<sup>TM</sup>, MLVA e sequenziamento. Successivamente sono state apportate una serie di modifiche, sulla base delle evidenze acquisite nella fase precedente, per migliorare la sensibilità diagnostica e per arrivare a valutare un metodo che potesse permettere di effettuare uno *screening* di animali

potenzialmente positivi al fine di contenere il numero di campioni da analizzare e il numero di isolamenti. Da un ulteriore gruppo di colombi (100) gli organi sono stati prelevati separatamente e conservati a -80°C con l'aggiunta di un terreno di trasporto antibiotato a base di saccarosio, fosfato di potassio, acido glutammico.

Da tale gruppo, i prelievi sono stati eseguiti dagli animali che sono stati selezionati sulla base dei risultati ottenuti attraverso una preliminare elaborazione di dati della prima fase di prelievo, ovvero introducendo il criterio selettivo adulti, femmine con epatomegalia pari od oltre il livello C della scala di *grading* (o in assenza considerando soggetti adulti/epatomegalia di grado elevato, eventualmente associata a splenomegalia di grado elevato).

## RISULTATI

La popolazione di colombi urbani esaminata era costituita dal 53% di animali adulti, di cui il 55% rappresentata da maschi e il 45% da femmine. Gli animali giovani hanno rappresentato il 47% del totale con una sottoripartizione del 54% di femmine e 46% di maschi.

I risultati sierologici per *C. psittaci* hanno mostrato una positività del 34.4% sulla popolazione studiata con una maggior prevalenza negli animali adulti. In tutti gli animali abbiamo potuto riscontrare che le lesioni a carico del fegato e milza erano ascrivibili solamente ad un aumento delle dimensioni dell'organo. Dallo *screening* in PCR, 55 animali sono risultati positivi per *Chlamydia spp.*, 45 per *C. psittaci* (prevalenza 10%), 9 per *C. pecorum* (prevalenza 2%), ed un campione per *C. abortus*. Dall'analisi preliminare dei dati raccolti attraverso le schede di rilevazione e dai risultati di PCR, si è notato come la presenza della epatomegalia sembrava essere maggiormente correlata alla presenza di *Chlamydia*, a differenza della splenomegalia anche di grado elevato. Nel campione iniziale di 439 colombi si è rilevata una maggiore prevalenza di positività in PCR nel gruppo di femmine adulte (15.4%) che insieme alla epatomegalia ha permesso di focalizzare l'attenzione negli animali di sesso femminile, con apparato riproduttore maturo e con epatomegalia nella seconda fase di campionamento. Dalla selezione effettuata sul successivo conferimento di 100 colombi, secondo il criterio adulto/epatomegalia/preferibilmente femmine/eventuale associazione con splenomegalia elevata, solo 10 soggetti presentavano i requisiti richiesti. Di questi, 5 sono risultati positivi in PCR, di cui 3 per *C. psittaci* (una considerata debole) e 2 per *C. pecorum*, ottenendo una prevalenza sui soggetti selezionati del 50%, superiore rispetto alla prevalenza della popolazione studiata (12,5%).

Le due metodiche tradizionali di isolamento utilizzate hanno per lo più evidenziato i medesimi risultati ad eccezione della *C. abortus* che è cresciuta solamente in uova embrionate, con una maggior percentuale di isolati nella seconda fase a seguito delle variazioni apportate.

La metodica *microarray* ha classificato le *C. psittaci* come genotipo B, E, E/B ed un ceppo di *C. psittaci* definito atipico i cui risultati non sono stati conclusivi. Sia questo ceppo che l'isolato di *C. abortus* sono stati confermati appartenenti alle rispettive specie mediante *microarray*. MLVA ha permesso invece di associare tutte le *C. psittaci* al genotipo 7, mentre *C. abortus* al genotipo 2. Il campione considerato allo *screening* iniziale come *C. psittaci* debole, non ha ottenuto conferme riguardo la sua appartenenza alla specie *C. psittaci*, mentre sia la *Real Time PCR Chlamydiaceae*

che l'*Array Tube*<sup>TM</sup> hanno mostrato positività al genere *Chlamydia*. Gli isolati risultanti invece dai campioni identificati inizialmente come *C. pecorum* sono stati confermati appartenere al genere *Chlamydia* ma purtroppo non si è potuto procedere all'identificazione di specie in quanto presentanti un *pattern* non chiaro. Il sequenziamento del gene *ompA* e del 16S rRNA ha permesso di evidenziare omologie con *C. psittaci* anche se il grado di omologia risulta essere basso ipotizzando la possibilità di nuovi ceppi.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dai risultati si può affermare che *C. psittaci* è presente nelle popolazioni di colombi di città a Venezia. È stata evidenziata una prevalenza di *Chlamydia* spp. sul totale dei campioni esaminati del 12,5% ed una prevalenza di *C. psittaci* del 10%.

I ceppi di *C. psittaci* isolati sono stati genotipizzati confermando la presenza nel colombo urbano del genotipo B, E, e del più recente E/B, ceppi che solitamente risultano essere coinvolti con minore frequenza in episodi di infezione umana. Abbiamo anche dimostrato la presenza di alcuni ceppi classificati come *Chlamydia* spp., in quanto le metodologie applicate e le conoscenze attuali non permettono ulteriori distinzioni prospettando la possibilità di un nuovo ceppo correlato con quelli dimostrati in Europa (6), una *C. psittaci* atipica ed una *C. abortus*. Dai risultati sierologici si è riscontrata una maggiore positività per *C. psittaci* nei colombi adulti rispetto a quelli giovani ed in tutti i soggetti risultati positivi per *C. pecorum* o *C. abortus* non è stata rilevata positività a livello sierologico per *C. psittaci*.

Infine, attraverso l'analisi dei dati raccolti durante la prima fase di campionamenti ed anche attraverso la conferma ottenuta durante la seconda fase, abbiamo strutturato un sistema di selezione, basato su caratteristiche funzionali ed anatomopatologiche (animali adulti, in fase riproduttiva, ed in particolare femmine con epatomegalia) che permette all'anatomo-patologo di selezionare in sede necroscopica i colombi molto probabilmente infetti, ottenendo una percentuale di positivi sui selezionati del 50%, rispetto alla prevalenza della popolazione studiata (12,5%). Tale approccio permette una migliore organizzazione e gestione dei campioni di maggior interesse, contenendo nel contempo i costi e mantenendo elevati gli *standard* diagnostici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, WB Whitman (2011). The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dyctioglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and *Planctomycetes*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 4. Springer (Ed.). pp: 843-865.
2. Kaleta EF and Taday Eva MA (2003). Review. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32(5): 435-462.
3. Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Mol Cell Probes.* 19(1): 41-50.

4. Laroucau K, Thierry S, Vorimore F, Blanco K, Kaleta E, Hoop R, Magnino S, Vanrompay D, Sachse K, Myers GS, Bavoil PM, Vergnaud G, Pourcel C. (2008). High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infect Genet Evol.* 8(2): 171-181.
5. OIE Terrestrial Manual (2008). Avian chlamydiosis. Section 2.3. Aves; Chapter 2.3.1.; pp: 431-442.
6. Laroucau K, Vorimore F, Aaziz R, Berndt A, Schubert E, Sachse K. (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect Genet Evol.* 9(6): 1240-1247.

## FOCOLAIO DI MAL ROSSINO IN UN ALLEVAMENTO DI FAGIANI.

Camarda A.<sup>1</sup>, Troiano P.<sup>2</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Caroli A.<sup>1</sup>, Legretto M.<sup>1</sup>, Pugliese N.<sup>1</sup>, Petrella A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata

Corresponding Author: prof. Antonio Camarda Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari, Strada provinciale per Casamassima Km. 3, 70010 Valenzano (Bari) e-mail:antonio.camarda@uniba.it

### SUMMARY

*Erysipelotrix rhusiopathiae* is the etiologic agent of erysipelas in animals. It is a worldwide diffused disease which affects swine and avian species. Erysipelas in avian is mostly reported in turkey and chicken, although its prevalence is probably underestimated. Even more rarely the disease is reported in wild species, but they could play an important role in disseminating the pathogen. Here we report an unusual focus of erysipelas in a pheasant (*Phasianus colchicus*) farm.

Ten 8-month old birds were brought to our facilities following a history of malaise, sensory impairment and mortality in a pheasant farm. At necropsy, we observed wide alopecic areas, with correspondent thickness of skin. Diffused hemorrhages were evident mainly along the muscles of chest, liver, spleen and epicardium. Catarrhal hemorrhages were also evident in the distal part of gut. Histological observations evidenced necrotic phlogistic foci characterized by fibrotic suppuration from gut and proventricula samples. Thrombotic areas were evident in kidney and spleen samples. In each case, microscopy observations showed bacterial cells and aggregate, also found in the blood. Bacteriological analyses let us isolate and identify *E. rhusiopathiae*. Following identification, a therapy with b-lactamic antimicrobial agents was administered, quick resolving the case.

This report confirms the *E. rhusiopathiae* may circulate in wild birds, such as pheasant. We hypothesize that overcrowding could have promoted the epidemic-like burden of the disease in the farm. Further studies should be carried out to verify the possibility that wild avian species such as pheasant could act as a *reservoir* for *E. rhusiopathiae*.

### INTRODUZIONE

Il mal rossino è una malattia cosmopolita sostenuta da *Erysipelotrix (E.) rhusiopathiae* (Wang et al., 2009). Il germe, responsabile del mal rossino nel suino, induce una grave forma di patologia anche nell'uomo che si manifesta con una caratteristica lesione cutanea nota con il nome di erisipeloide (Brooke et al., 1999).

Negli uccelli *E. rhusiopathiae* è segnalato in particolare nel tacchino (Bricker and Saif, 2003), che manifesta la sintomatologia clinica a tutte le età, ma anche in numerose altre specie domestiche e selvatiche (Mutalib et al, 1993, Eriksson et al., 2010, Brännström et al., 2008 Opriessing et al., 2005).

La circolazione del germe negli allevamenti intensivi di pollame sembra essere sottostimata, anche perché non sempre soggetti sierologicamente positivi manifestano sintomatologia clinica e mortalità (Eamens et al., 1988).

Il coinvolgimento di specie selvatiche allevate a scopo di ripopolamento venatorio è segnalato raramente (Milne et al., 1997, Bygrave et al., 1997). Tuttavia, la comparsa della malattia in questo tipo di animali apre interrogativi importanti circa il ruolo da essi giocato nella diffusione del germe nell'ambiente naturale.

In questo lavoro è stato descritto un inusuale focolaio di mal rossino osservato nel 2008 che ha interessato un gruppo di fagiani (*Phasianus colchicus*) allevati a scopo di ripopolamento venatorio. e discusse le cause che ne hanno probabilmente favorito la comparsa e condizionato la gravità.

### **Descrizione del focolaio**

Nel mese di Dicembre 2008 sono stati conferiti presso l'U.O. di Diagnostica dell'IZSPB di Foggia n. 10 esemplari di fagiani (*Phasianus colchicus*) di circa 250 giorni di età, provenienti da un gruppo di circa 800 capi, allevati in cattività a scopo di ripopolamento venatorio.

L'allevatore, al momento del conferimento delle carcasse, riferì che aveva osservato abbattimento e depressione del sensorio in circa il 20-25% degli animali allevati e che di questi la quasi totalità era deceduta. Interessante il rilievo della mortalità, che aveva interessato in particolare i maschi.

Le lesioni anatomopatologiche repertate erano suggestive di uno stato setticemico generalizzato. L'esame esterno consentiva di evidenziare ampie aree deplumate specie sul dorso, un ispessimento della cute corrispondente, che presentava soluzioni di continuo e croste. Allo scuoiamento, si osservavano emorragie muscolari diffuse che colpivano in particolare i muscoli pettorali. All'apertura delle cavità splancniche, era costante il rilievo di emorragie diffuse al fegato, e di spleniti con emorragie puntiformi in superficie. Si osservavano, inoltre, emorragie subepicardiche e gravi forme di enterite catarrale-emorragica localizzate a livello della porzione distale del piccolo intestino.

Nel lume del cieco era rilevabile una blanda infestazione da *Heterakis gallinae*.

### **Esami di Laboratorio**

All'esame istopatologico era costante una flogosi fibrino-purulenta necrotizzante associata a batteri Gram positivi che colpiva il proventricolo e l'intestino. A carico di milza e rene, invece, era evidente una trombosi vascolare con colonie batteriche associate a istiociti, mentre focolai necrotici diffusi erano presenti nel fegato e nel miocardio. Aggregati batterici si osservavano, inoltre, nel torrente circolatorio e in numerosi altri distretti organici.

L'esame batteriologico è stato effettuato a partire da fegato, milza e sangue del cuore su agar sangue di montone, incubato a 37°C in aerobiosi e in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> (fig.7).

Le colonie sospette sono state sottoposte a valutazione microscopica, morfologica e tintoriale previa colorazione di Gram ed ad indagini biochimiche in micrometodo mediante il sistema "API Coryne" (Biomérieux). Ottenuto un profilo riferibile a *E. rhusiopathiae* (99,9%), si è proceduto ad effettuare indagini biomolecolari di conferma.

Il riconoscimento dell'agente eziologico e la diagnosi di certezza hanno consentito di allestire una idonea terapia con un beta-lattamico somministrato per 5 giorni in acqua da bere. Il trattamento ha rapidamente determinato la guarigione clinica degli animali.

## DISCUSSIONE

Il mal rosso nelle specie aviari è responsabile di focolai di malattia di rilevante impatto economico soprattutto nei tacchini. Nelle altre specie di uccelli, la forma morbosa si riscontra meno comunemente, e nonostante che possa causare una setticemia acuta, più spesso decorre in maniera asintomatica (Henning et al., 2002).

La comparsa del mal rosso nel fagiano e la gravità del focolaio sono stati associati a intercorrenti infestazioni parassitarie, quali ad esempio *Hexamita meleagridis* nel piccolo intestino e nei ciechi o anche ad infestazioni multiple da *Capillaria spp.*; *Heterakis spp.* e *Syngamus trachea*. Il danno subito dalla mucosa intestinale, favorirebbe l'attecchimento di *E. rhusiopathiae* con conseguente setticemia (Bricker et Sayf, 2003). Alla stessa stregua, nel focolaio descritto in questo lavoro, non si può escludere che la presenza sia pure contenuta di *Heterakis* nell'intestino dei fagiani deceduti potrebbe aver predisposto l'attecchimento di *E. rhusiopathiae*. Non è escluso che le condizioni di sovraffollamento in cui gli animali versavano e la persistenza per un periodo troppo lungo di tempo nelle voliere di ambientamento abbia ulteriormente accentuato la gravità del focolaio. Il lancio nelle zone di ripopolamento era infatti stato posticipato a causa dell'insorgenza di problemi burocratici che non consentivano l'immissione sul territorio del gruppo.

La malattia, ha pertanto interessato soprattutto i maschi, notoriamente soggetti ad una maggiore aggressività territoriale. Questi animali presentavano infatti soluzioni di continuo e fenomeni di plumofagia e cannibalismo tipici di una condizione di sovraffollamento del gruppo.

Le indagini epidemiologiche, prontamente attivate successivamente alla diagnosi malattia, hanno consentito di individuare in alcuni suini, allevati nelle vicinanze dell'allevamento per consumo familiare, la probabile fonte di infezione del gruppo. Purtroppo gli animali non erano più disponibili al momento dello scoppio del focolaio e non è stato possibile accertare se fosse da imputare ad essi l'origine del germe.

Il lancio dei fagiani sul territorio al termine del trattamento antibiotico e dopo la remissione della sintomatologia clinica che ha determinato l'estinzione del focolaio, apre degli interrogativi circa l'impatto esercitato nell'ambiente dalla liberazione di animali provenienti da un focolaio di tale malattia infettiva e contagiosa. Nel tempo intercorso tra la liberazione degli animali e la stesura del presente lavoro non vi sono state segnalazioni di mal rossino sia negli animali domestici che in quelli selvatici dell'area. Tuttavia, indagini scientifiche approfondite sarebbero necessarie per accertare se il fagiano possa giocare un ruolo di serbatoio di *E. rhusiopathiae*, valutando, ad esempio, la persistenza del germe nell'organismo dopo il superamento della malattia. Non sarebbe secondario, infine, comprendere se l'azione di eventi stressanti, quale ad esempio il lancio e l'immissione sul territorio possa influire sulla durata dell'eliminazione del microrganismo da parte di fagiani infetti che hanno superato la malattia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bricker JM, Saif YM (2003). Erysipelas in: Saif YM (ed.) *Diseases of poultry*. Iowa State press, Ames pp 812-826.
2. Brännström S, Morrison DA, Mattsson JG, Chirico J (2008). Genetic differences in internal transcribed spacer 1 between *Dermanyssus gallinae* from wild birds and domestic chickens. *Vet Med Entomol*, 22: 152-155.
3. Brooke CJ, Riley TV (1999). *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol*, 48: 789-799
4. Bygrave AC (1997). An outbreak of erysipelas in pheasant poults (*Phasianus colchicus*). *Vet Rec*, 89: 279-80.
5. Eamens GJ, Turner MJ, Catt RE (1988). Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Australian pigs, small ruminants, poultry, and captive wild birds and animals. *Aust Vet J*, 65: 249-52.
6. Eriksson H, Brännström S, Skarin H, Chirico J (2010). Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from laying hens and poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) from an outbreak of erysipelas. *Avian Pathol*, 39: 505-9.
7. Henning GE, Goebel HD, Fabis JJ and Khan MI (2002). Diagnosis by Polymerase Chain Reaction of Erysipelas Septicemia in a Flock of Ring-Necked Pheasants. *Avian Diseases* 46: 509-514.
8. Milne EM, Windsor RS, Rogerson F, Pennycott TW (1997). Concurrent infection with enteric protozoa and *Erysipelothrix rhusiopathiae* in chicken and pheasant flocks. *Vet Rec*, 141: 340-341.
9. Mutalib A, King JM, McDonough PL (1993). Erysipelas in caged laying chickens and suspected erysipeloid in animal caretakers. *J Vet Diagn Invest*, 5: 198-201
10. Opriessnig T, Vance RK, Halbur PG (2005). *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in a Laughing kookaburra (*Dacelo novaeguineae*). *J Vet Diagn Invest*, 17: 497-499.
11. Wang Q, Chang B, Riley TV (2010). *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol*, 140: 405-417.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Sig. Francesco Tolve e la Sig.ra Esther De Simone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata per l'indispensabile supporto tecnico fornito nella realizzazione del presente lavoro.



## VARIAZIONE NEL TEMPO DELLA SENSIBILITÀ DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NEI CONFRONTI DI MOLECOLE ACARICIDE UTILIZZATE IN CAMPO

Caroli A.<sup>1</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Di Paola G.<sup>1</sup>, Cafiero M.A.<sup>2</sup>, Giangaspero A.<sup>3</sup>, Pugliese N.<sup>1</sup>, Legretto M.<sup>1</sup>, Camarda A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia.*

### Summary

#### **Time-variation of susceptibility of *Dermanyssus gallinae* against acaricides employed in field.**

*Dermanyssus gallinae* infestation is a major threat for industrial poultry farms. The mite is worldwide diffused, and its prevalence is very high: it is reported that more than 80% of poultry farms are infested in some European Countries. The infestation leads to detriment of animal welfare and economic losses, as it negatively affects the egg and meat production. It may also contribute to the diffusion of infectious diseases as it has been widely recognized as a vector of a number of pathogens. Remarkably, *D. gallinae* could be also considered an occupational hazard, as it may infest the poultry farm workers.

Currently, the control of *D. gallinae* infestation is performed by using specific drugs such as carbamates, organophosphates, pyrethroids or amidines (amitraz), but most of them can not be used in presence of live animals. Furthermore, in field and *in vitro* reports have been assessing the increase in acaricide resistances. In the light of these premises, we evaluated the susceptibility of field populations of *D. gallinae* against three acaricide drugs, namely phoxim (an organophosphate), Amitraz and l-Cyhalothrin (a pyrethroid). A total of 68 mite populations were collected from Italian industrial poultry farms for a four-year period (2008-2012), and their susceptibility to the selected drugs have been tested at field-use concentration (1X) and at lower (1/2X and 1/4X) and higher (2X and 4X) concentrations. The data showed that l-Cyhalothrin exhibits a lower efficacy if compared with the other two drugs. By comparing the effectiveness of the drugs by years, we found that resistance to Amitraz is constantly increasing since 2008 to 2012, while effectiveness of Phoxim has been decreasing since 2009 to 2010, while it has been increasing for the last two years. The mite resistance to l-Cyhalothrin has been decreasing since 2009 to 2011, but in 2012 its efficacy has significantly collapsed. Such trends remained the same independently by the concentrations. Interestingly, higher concentrations did not provide a significant increase of drug efficacy.

On aggregate, our data show an increment in mite resistances against the most used acaricides, even if the trends are different for each drug. To avoid a further decrease in drug effectiveness, it should be advisable a turn over of drugs usually employed

against *D. gallinae* in field. The use of drugs at different concentration than those recommended by manufacturers. Finally, the understanding of the genetic bases of the acaricide resistance may greatly help to struggle the insurgence and diffusion of resistant *D. gallinae* strains.

## INTRODUZIONE

*Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1978) (Mesostigmata: Dermanyssidae) rappresenta uno dei problemi parassitologici più rilevanti ma anche più sottovalutati che l'avicoltura moderna si trova ad affrontare. Questo acaro, infesta prevalentemente il pollo ed il tacchino, ma è segnalato anche in numerose specie di uccelli selvatici e d'affezione. È diffuso sia negli allevamenti avicoli a terra sia in quelli in batteria, prediligendo particolarmente le galline ovaiole e i riproduttori (Chauve, 1998). La sua importanza è evidente se si esaminano le statistiche sulla prevalenza negli allevamenti di vari paesi Europei ed extraeuropei: le prevalenze di *D. gallinae*, infatti, in numerosi paesi, possono raggiungere valori dell'80-90% (Sparagano *et al.*, 2009), con punte del 100% in alcune aree della Polonia (Cencek, 2003).

*D. gallinae* è un parassita ematofago obbligato, non permanente in quanto rimane sull'ospite solo il tempo necessario ad effettuare il pasto di sangue (Baker, 1999). Il livello di infestazione sull'animale può essere molto elevato (si stimano popolazioni di acari anche fino a 30.000 per soggetto), e si traduce frequentemente in sintomi clinici e cali della produzione che difficilmente l'allevatore attribuisce all'azione del parassita (Nordenfors *et al.*, 2000).

Questa parassitosi è da considerare senz'altro una patologia professionale; gli acari, infatti, frequentemente infestano gli operatori addetti alla cura degli animali, che riportano rush cutaneo, prurito e dermatite (Cafiero *et al.*, 2011).

*D. gallinae* è stato anche riconosciuto quale potenziale vettore di vari agenti patogeni (ad es. *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis*, *Chlamidia psittaci*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*) per l'uomo o per gli animali (Chirico *et al.*, 2003; Valiente Moro *et al.*, 2009; Circella *et al.*, 2011; Camarda *et al.*, 2012). Questa abilità renderebbe possibile la diffusione e la persistenza di patologie all'interno degli allevamenti anche dopo periodi di vuoto sanitario (Camarda *et al.*, 2012).

Per il controllo delle infestazioni da *D. gallinae* sono impiegate numerose molecole: carbammati, organofosforici, piretrine e piretroidi, amidine (amitraz) (Chauve, 1998). Alcune di queste, in particolare Amitraz, Piretrine e Piretroidi sono comunemente e dichiaratamente impiegate negli allevamenti avicoli italiani (Cafiero *et al.*, 2010). Un fattore limitante all'uso degli acaricidi negli allevamenti consiste nel loro divieto di utilizzazione in presenza di animali. Da pochi anni, è stata introdotta sul mercato una molecola appartenente alla classe degli organofosforici (phoxim) (ByeMite, Bayer®) caratterizzata da un periodo di sospensione di sole 12 ore e pertanto impiegabile anche in capannoni in cui siano accasati animali.

La riduzione dell'efficacia degli acaricidi segnalata in campo dagli operatori del settore, ma anche da recenti risultanze sperimentali (Marangi *et al.*, 2009) ha ispirato il presente lavoro in cui tre diverse molecole acaricide, appartenenti alle classi più frequentemente impiegate negli allevamenti, sono state testate *in vitro* su popolazioni di *D. gallinae* provenienti da aziende avicole distribuite sul territorio italiano. La ricerca, condotta in un arco di tempo di circa 5 anni, ha inteso valutare l'evoluzione della sensibilità manifestata dalle popolazioni di acari nel tempo.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra Ottobre 2008 e Luglio 2012 sono state testate popolazioni di *Dermanyssus gallinae* raccolte da un totale di 68 diversi allevamenti (2008 n.3; 2009 n.14; 2010 n.24; 2011n.14; 2012 n.13) avicoli intensivi di cui 62 di galline ovaiole e 6 di riproduttori pesanti provenienti da 8 regioni italiane (Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Abruzzo, Puglia, Basilicata, Sicilia) selezionate tra quelle a maggiore vocazione avicola. Da ciascun allevamento sono stati raccolti un minimo di 3000 acari, presenti in prossimità delle mangiatoie e dei nastri trasportatori, in tutti gli stadi del ciclo biologico. Il campione di acari, in condizioni di refrigerazione, è giunto in laboratorio entro le 24 ore dalla raccolta. All'arrivo, gli esemplari di *D. gallinae* sono stati tenuti a digiuno per 5 giorni al buio e a temperatura ambiente. Gli acaricidi sono stati testati *in vitro* alle concentrazioni consigliate dal produttore per l'uso in campo. Per il Phoxim e l'Amitraz tale concentrazione è 0,2% mentre per la  $\lambda$ -Cyalothrina è 0,05%. Per ogni sostanza, oltre alla concentrazione di campo, classificata come 1X, sono state testate sperimentalmente altre quattro concentrazioni, rispettivamente 2 e 4 volte superiori (2X, 4X) e 2 e 4 volte inferiori ( $\frac{1}{2}$ X,  $\frac{1}{4}$ X) alla dose di campo.

Il test è stato allestito secondo la metodica descritta da Thind e Muggleton già applicata in un precedente lavoro (Marangi et al., 2009). Le soluzioni degli acaricidi sono state preparate al momento dell'uso. In breve, tra due supporti in plexiglass forati al centro sono state poste carte da filtro del tipo Whatman n.1. Ciascuna carta da filtro è stata impregnata con 0,2 ml di farmaco; successivamente 20 acari a tutti gli stadi di sviluppo, raccolti *random* da ciascun campione, sono stati posizionati nella depressione centrale creata su ciascuna carta da filtro, quindi, coperti con un altro foglio circolare di carta da filtro e chiusi con delle graffette a formare delle camerette. Ciascuna cameretta è stata incubata per 24 ore a 20°C e 60% di umidità. Per ogni diluizione sono state eseguite tre ripetizioni e previsto il rispettivo gruppo controllo, costituito ciascuno da 20 acari posti su carta da filtro impregnata da un egual volume di acqua distillata. Dopo 24 ore tutte le camerette sono state aperte e sono stati contati gli acari morti e gli acari vivi.

Dalle tre ripetizioni è stato calcolato il valor medio del numero di acari trattati vivi, che, riportato nella formula seguente, ha consentito il calcolo della percentuale di efficacia:

$$\% \text{ di efficacia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ di acari di controllo vivi} - \text{n}^\circ \text{ acari trattati vivi}}{\text{n}^\circ \text{ di acari di controllo vivi}} \times 100.$$

L'interpretazione dei risultati è stata condotta attraverso statistiche descrittive in particolare valor medi, varianze e frequenze.

In riferimento alla variazione della sensibilità nel tempo, si è scelto di escludere il 2008 dalla valutazione dei risultati a causa dello scarso numero di allevamenti testati nell'anno.

## RISULTATI

Considerando i 68 campioni nel loro complesso, prescindendo dall'anno di prelievo, è stata calcolata l'efficacia media e la varianza per ogni farmaco alla concentrazione di campo, rappresentate dagli istogrammi e dalle curve riportati nelle figure fig. 1a, 1b, 1c. Confrontando le tre curve così costruite, con media e varianza pari alla media

e alla varianza per ogni farmaco, è stato possibile evidenziare graficamente le differenze dei valori di efficacia dei tre farmaci (fig. 1d).

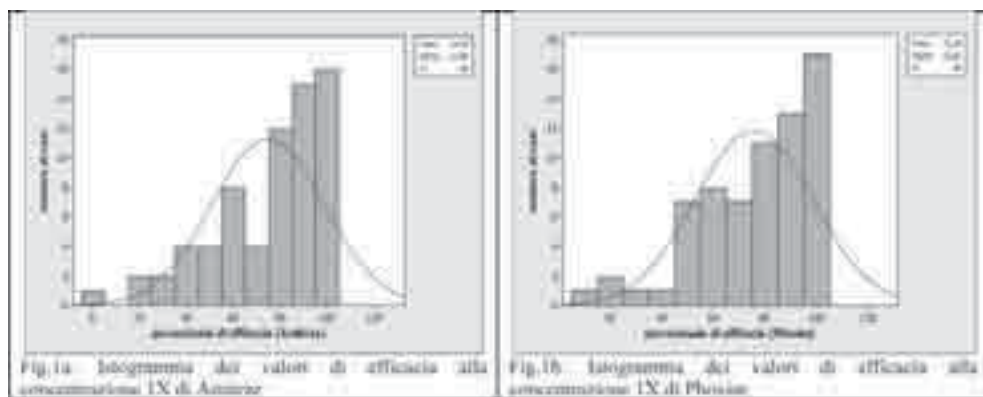


Fig.1a. Istogramma dei valori di efficacia alla concentrazione 1X di Amitraz

Fig.1b. Istogramma dei valori di efficacia alla concentrazione 1X di Phoxim

Nel complesso le curve di Phoxim e Amitraz sono risultate tra loro analoghe (valor medio di efficacia pari a 75.6% e 74.6% e Deviazione standard pari a 22.8 e 23.9); viceversa si nota un netto scostamento della  $\lambda$ -Cyalothrina (Fig. 1) che in generale appare meno efficace.

Confrontando i valori medi di efficacia alla concentrazione di campo, divisi per anno, si nota un differente comportamento di Amitraz e Phoxim (Fig. 2). Infatti, l'efficacia media di Amitraz, tende a diminuire significativamente dal 2009 (85,95%) al 2012 (48.85%), mentre quella di Phoxim diminuisce inizialmente tra il 2009 (81,43%) e il 2010 (68.6%) ma aumenta tra il 2011 (72.1%) e il 2012 (81.0%).

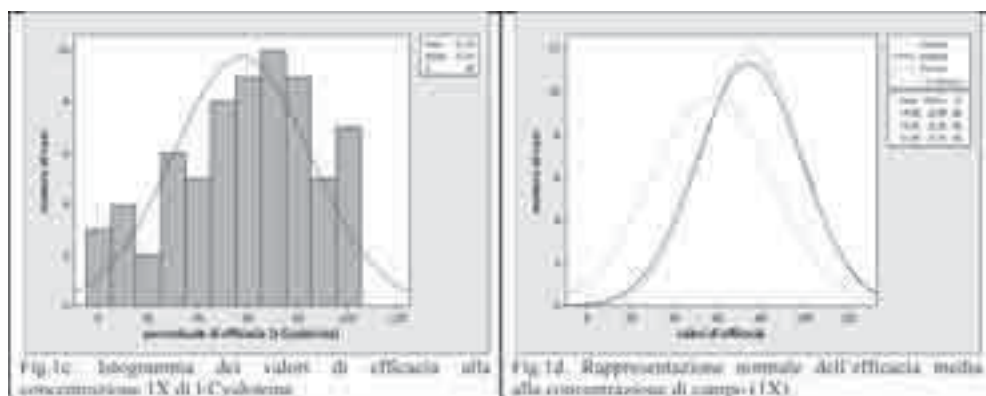


Fig.1c. Istogramma dei valori di efficacia alla concentrazione 1X di l-Cyalothrina

Fig.1d. Rappresentazione normale dell'efficacia media alla concentrazione di campo (1X).

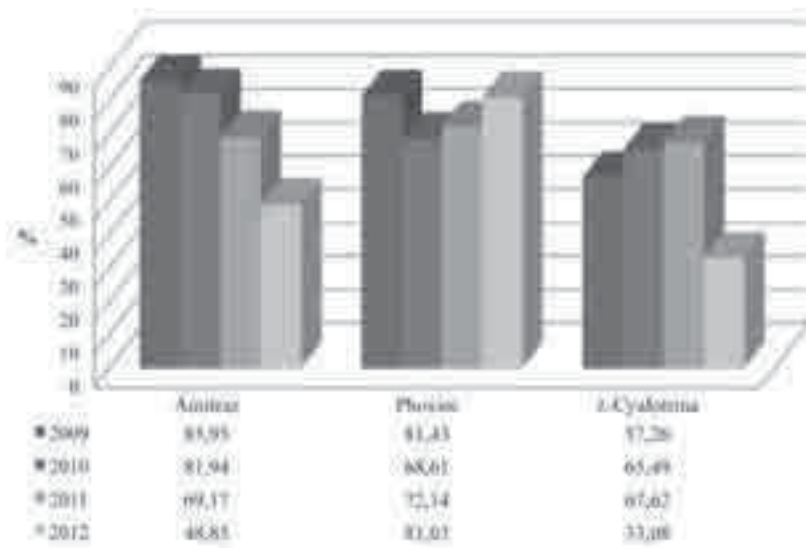


Fig. 2: Efficacia media alla concentrazione 1X per anno.

Analizzando il comportamento della singola molecola nel tempo alle diverse concentrazioni testate *in vitro*, si osservano alcune differenze. Per l'Amitraz è evidente una perdita di efficacia sia negli anni, sia al diminuire della concentrazione (Fig. 3). Per il Phoxim la tendenza è meno apprezzabile. Si osservano, infatti, soltanto variazioni dipendenti dalla concentrazione. In generale a tutte le concentrazioni eccetto la 1/4x, si osserva una diminuzione di efficacia fino all'anno 2010 e una ripresa negli anni 2011 e 2012 (Fig. 4)

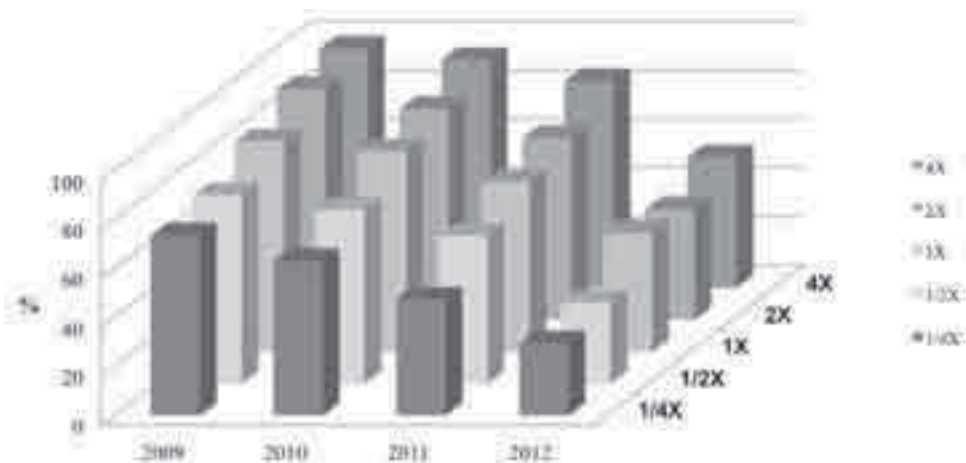


Fig.3: Efficacia media dell' Amitraz alle concentrazioni 2X, 4X, 1/2X, 1/4X, dal 2009 al 2012.

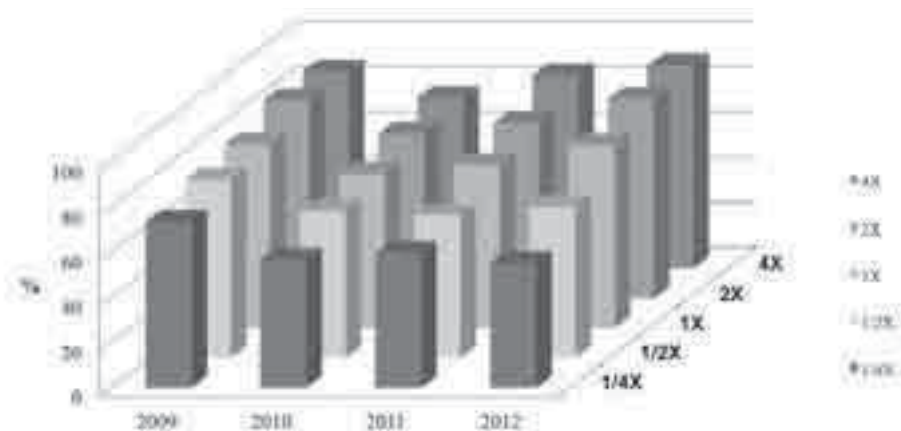


Fig.4: Efficacia media del Phoxim alle concentrazioni 2X, 4X, ½X, ¼X, dal 2009 al 2012.

La  $\lambda$ -Cyalothrina ha un andamento diverso rispetto ai due acaricidi precedentemente analizzati; infatti, presenta una tendenza all'aumento di efficacia nella prima fase (dal 2009 al 2010), seguita da un decadimento nella seconda fase (dal 2011 al 2012) (Fig.5).

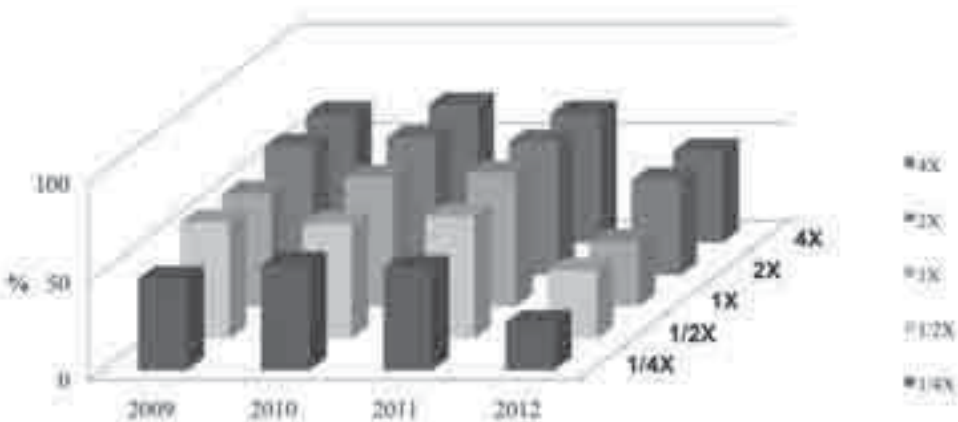


Fig.5: Efficacia media della  $\lambda$ -Cyalothrina alle concentrazioni 2X, 4X, ½X, ¼X, dal 2009 al 2012.

Nella Fig. 6 è rappresentato lo scostamento nel tempo del livello medio di efficacia rispetto ad un anno di riferimento. Per una maggiore omogeneità della dimensione del campione nel tempo l'anno di riferimento è il 2009. L'analisi è ristretta alla comparazione tra la concentrazione di campo (1X) e quella 2 volte maggiore (2X). Per quanto concerne l'Amitraz si evidenzia nel tempo un peggioramento del livello medio di efficacia che è maggiore per la concentrazione 2X. Al contrario, per il Phoxim si nota nel tempo un contenimento della diminuzione di efficacia. La riduzione

è stata maggiore nei primi anni di osservazione. Nel complesso il comportamento delle due concentrazioni è quasi sovrapponibile.

Per la  $\lambda$ -Cyalothrina in una prima fase si assiste ad un incremento medio dell'efficacia, che è maggiore per la concentrazione 1X, mentre nell'ultima fase si osserva una riduzione del livello medio di efficacia, maggiormente contenuto per la 2X.

È stata, infine, considerata l'attività delle tre molecole, alle diverse concentrazioni, considerando la variabilità dell'efficacia nel campione. A tal fine sono stati costruiti degli istogrammi rappresentando le frequenze dei valori di efficacia nelle classi dell'istogramma (denominate classi di efficacia) (Fig.7). Le distribuzioni per il Phoxim e l'Amitraz evidenziano una maggior frequenza di valori di efficacia nell'intervallo compreso tra il 50% e il 100%. In particolare, alla dose di campo i valori di efficacia media si attestano maggiormente tra il 75% e il 100%. Per la  $\lambda$ -Cyalothrina la distribuzione è più uniforme, ed interessa con maggior frequenza rispetto alle altre molecole, le classi di efficacia comprese tra il 25%-50% e 51-75%.

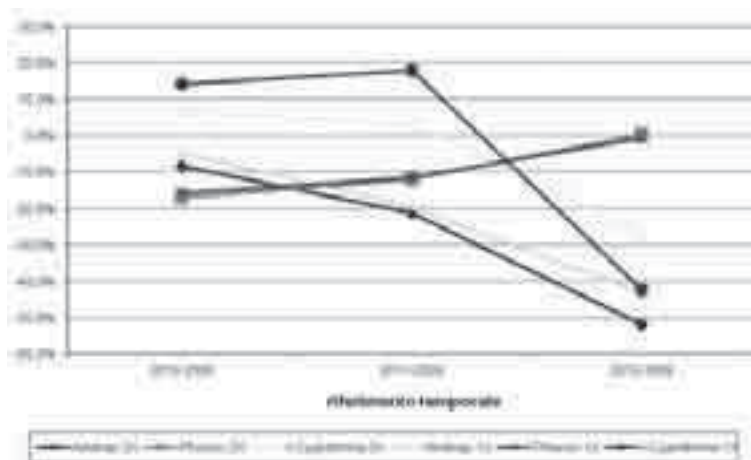


Fig.6: Scostamento percentuale del livello medio di efficacia.

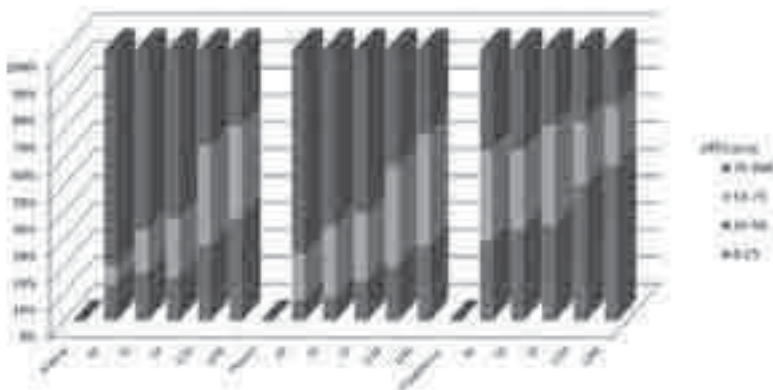


Fig. 7: Rappresentazione delle frequenze dei valori medi per classi di efficacia.

## DISCUSSIONE

La resistenza degli acari ai farmaci antiparassitari è un serio problema per il controllo delle infestazioni negli allevamenti avicoli intensivi (Marangi et al., 2009). Nel presente studio, è stato valutato l'andamento dell'efficacia di tre sostanze tra le più usate come acaricidi.

Nel complesso, Amitraz e Phoxim hanno manifestato livelli di efficacia mediamente elevati. Tuttavia, le popolazioni di *D. gallinae* testate nel 2012 hanno manifestato alla concentrazione di campo un aumento della percentuale di resistenza nei confronti dell'Amitraz superiore al 50%. Al contrario, le percentuali di resistenza verso Phoxim sono più basse, attestandosi nel 2012 al 19,97%. Il calo di attività di Amitraz nei confronti dell'acaro rosso può essere giustificato da un uso ampio e frequente del prodotto, probabilmente al di fuori di razionali programmi di profilassi. Questo potrebbe aver accentuato la selezione di popolazioni resistenti e reso, nel volgere di pochi anni, il principio attivo molto meno efficace.

L'aumento della dose risolve parzialmente il problema della resistenza. Infatti, ad un aumento della concentrazione non sempre corrisponde un incremento significativo dell'efficacia, come osservato per il Phoxim. Inoltre, l'insorgenza di fenomeni di resistenza può essere maggiore per le concentrazioni più alte, come evidenziato per Amitraz.

Nel complesso la  $\lambda$ -Cyalothrina ha mostrato performances significativamente inferiori rispetto agli altri due acaricidi. È possibile che la causa di questo fenomeno sia ascrivibile oltre che alla resistenza specifica nei suoi confronti da parte del *D. gallinae*, anche dalla rapida degradazione del prodotto che, se da un lato garantisce una scarsa tossicità della molecola, dall'altro mal si adatta con le caratteristiche biologiche dell'acaro, il quale è generalmente ben nascosto dalle attrezzature e dalle strutture d'allevamento (ad esempio gabbie, nastri trasportatori, tubi di aereazione e di soffiaggio) e potrebbe venire in contatto con il prodotto solo dopo che questo ha perso la sua efficacia.

I dati che scaturiscono da questa esperienza mostrano che nel periodo considerato le popolazioni di *D. gallinae* che colonizzano gli allevamenti avicoli intensivi italiani sono meno suscettibili ai farmaci utilizzati per il loro controllo. È quindi auspicabile un uso accorto di queste sostanze in campo, così da non favorire la selezione di popolazioni resistenti.

L'applicazione di programmi di rotazione degli acaricidi e l'impiego di molecole preventivamente testate in laboratorio sulla popolazione di acari da trattare dovrebbero essere il principio guida nell'approccio al controllo delle infestazioni da *Dermanysus* negli allevamenti.

Non va, inoltre, sottovalutata l'importanza sia dell'impiego di soli prodotti il cui uso sia autorizzato in presenza di animali, al fine di evitare il rischio della persistenza di residui nelle carni e nelle uova, sia di molecole per le quali non sia proibita da tempo la commercializzazione.

A questo proposito, un recente studio ha dimostrato la presenza di residui di Permetrina e soprattutto di Carbaryl (molecola il cui impiego è vietato in UE dal 2007) su campioni di pelle e grasso di ovaiole a fine carriera (Marangi et al., 2012). È evidente che la diffusione e la manipolazione di dati di questo tipo potrebbero avere ripercussioni negative sull'intero comparto avicolo.

Un'ultima considerazione deve necessariamente riguardare la modalità e la frequen-



za di somministrazione dei prodotti acaricidi che spesso inficia l'efficacia stessa del trattamento anche quando sono utilizzate molecole attive nei confronti degli acari.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano che, a causa di un impiego non corretto o un abuso di trattamenti acaricidi, l'efficacia degli acaricidi può variare nel tempo e, una riduzione di efficacia può essere dovuta alla selezione di popolazioni di *Dermanyssus* resistenti che risultano sempre più difficili da controllare.

Il ricorso a programmi di profilassi che non si limitino al solo uso di molecole anti-parassitarie è pertanto fondamentale per ottenere risultati positivi nella lotta contro *Dermanyssus gallinae*.

In particolare, si dovrebbe evitare l'uso di concentrazioni diverse da quelle ottimali. Infatti, concentrazioni più basse potrebbero favorire la selezione e quindi la comparsa di ceppi resistenti, mentre l'impiego di molecole a concentrazioni più elevate, oltre a non escludere la possibilità di selezione di ceppi resistenti, determinerebbe danni (ambientali economici, sanitari) che non giustificerebbero affatto il pur immediato beneficio.

## BIBLIOGRAFIA

Baker A.S. (1999). Mites and ticks of domestic animals. An identification guide and information source. The Stationery Office, The Natural and History Museum, London 240 pp.

Cafiero M. A., Galante D., Camarda A., Giangaspero A., Sparagano O. (2011). Why dermanyssosis should be listed as an occupational hazard. *Occupational and Environmental Medicine*, 68(8): 628.

Cafiero M.A., Camarda A., Giangaspero A., Circella E., Sparagano O.A.E. (2010). Epidemiology and health risks related to *Dermanyssus gallinae* infestation. *Parasitologia*, 52: 53-56.

Camarda A., Pugliese N., Legretto M., Cafiero M. A., Stonfer M., Circella E. (2012). Survey on the presence of *Salmonella gallinarum* in *Dermanyssus gallinae* in intensive Poultry farms. WPC2012 Salvador - Bahia - Brazil, 5 - 9 August - 2012 World's Poultry Science Journal, Supplement 1, 335-337

Cencek T. (2003). Prevalence of *Dermanyssus gallinae* in poultry farms in Silesia Region in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47:465-469.

Chauve C. (1998). The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer 1778): current situation and future prospects for control. *Veterinary Parasitology* 79(3): 239-245.

Chirico J., Eriksson H., Fossum O., Jansson D. (2003). The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 232-234.

Circella E., Pugliese N., Todisco G., Cafiero M. A., Sparagano O. A., Camarda A. (2011). *Chlamydia psittaci* infection in canaries infested by *Dermanyssus gallinae*. *Experimental & Applied Acarology*, 55(4): 329-338.

Marangi M., Cafiero M. A., Capelli G., Camarda A., Sparagano O. A.E., Giangaspero A. (2009). Evaluation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) susceptibility to some acaricides in field populations from Italy. *Experimental & Applied Acarology*, 48(1-2): 11-8.

- Marangi M., Morelli V., Pati S., Camarda A., Cafiero M. A., Giangaspero A. (2012). Acaricide residue in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. PloS one, 7(2): e31795.
- Nordenfors H., Hoglund J. (2000). Long term dynamics of *Dermanyssus gallinae* in relation to mite control measures in aviary systems for layers. British Poultry Science, 41:533-540.
- Sparagano O., Pavlicevic A., Murano T., Camarda A., Sahibi H., Kilpinen O., Mul M., Van Emous E., Le Bouquin S., Hoele S., Cafiero M.A. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infection in poultry farm system. Experimental & Applied Acarology, 48: 3-10.
- Thind B. B., Muggleton J. (1998). A new bioassay method for the detection of resistance to pesticides in the stored product mite *Acarus siro* (Acari: Acaridae). Experimental & Applied Acarology, 22: 534-552.
- Valiente Moro C., De Luna C. J., Tod A., Guy J. H., Sparagano O. A. E., Zenner L. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. Experimental & Applied Acarology, 48: 93-104.

## 1992 - 2012 PROBIOSI: STORIA O SFIDA?

Castello M.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Libero Professionista - Via Dante, 60 13100 VERCELLI  
mccastello@fastwebnet.it*

**Parole chiave:** probiotici, Broiler, Poultry History

**Use of *Lactobacillus* spp. as probiotic in broiler breeder flocks.**

Key words: probiotics, broiler, Storia dell'avicoltura.

**Summary:** In this work Author had tested in field the utility of the use of *Probiosis* in 20 years experience in rearing broilers flocks. Particular attention has been placed to the benefits reached in zoo-economical results.

### INTRODUZIONE

La microflora gastrointestinale di animali adulti e sani varia enormemente in funzione di numerose e complesse interazioni in grado di inibire la colonizzazione di patogeni invasivi.

Squilibri in tale ecosistema riducono l'effetto di protezione della microflora autoctona fornendo una valida opportunità ai microrganismi patogeni enterici di colonizzare l'intestino.

Questa patologica situazione si può facilmente osservare negli animali durante i periodi di stress o in seguito a somministrazione di antibiotici.

Non è tuttavia da sottovalutare che, anche in situazioni cosiddette normali, i nostri polli da carne, allevati secondo rigide norme di igiene e prevenzione, vivono in modo ben diverso dal fisiologico modo di nascere e crescere naturale.

Solo in un ambito naturale, infatti, i pulcini ricevono quella flora microbica che è parte integrante e inscindibile dall'apparato digerente.

Non è questa la sede per dilungarci in disquisizioni e spiegazioni sulla necessaria presenza di una flora microbica fisiologica per dare quel giusto equilibrio e corretta funzionalità all'apparato digerente. La letteratura, a tal proposito, ci fornisce dettagliato ed abbondante materiale esplicativo e ad essa rimandiamo.

L'esclusione competitiva e l'apporto diretto di flora microbica, rappresentano quell'intervento di profilassi indiretta operato al fine di migliorare l'equilibrio microbico intestinale.

Durante 20 anni di lavoro di campo si è avuta la possibilità di raccogliere e documentare la potenzialità di tale metodo sul miglioramento dei risultati zoo economici, sul miglioramento del benessere degli animali allevati e sulla possibilità di ridurre l'uso di farmaci antibiotici nell'allevamento (argomento di estrema attualità).

Con il seguente lavoro si intende evidenziare e mettere a disposizione di tutti come la somministrazione in acqua di bevanda di una flora costituita da cellule vive di specie batteriche selezionate produttrici di acido lattico, specifiche per specie avicole, abbia influito sul miglioramento delle performance produttive di una azienda di produzione broiler.

In pratica vogliamo evidenziare le potenzialità di tale metodo senza false illusioni nè

affrettate disillusioni.

Il numero degli animali ed il consolidamento della pratica attraverso la durata della sua applicazione sono garanti della realistica dei dati mostrati.

Sarà compito di ciascun zoognosta trovare l'eventuale utilità ed i vantaggi che tale metodo potrebbe apportare in ogni singola realtà produttiva e decidere, di conseguenza e secondo i casi, se possa essere conveniente o meno accettare ed utilizzare tale metodo.

## **MATERIALI E METODI**

Il periodo che prenderemo in esame, attraverso i risultati raccolti e che mostreremo, va dal 1993 al 1997, ossia 5 anni. E' stata presa in considerazione questa fase in quanto ha coinciso con il periodo nel quale si sono conservati i risultati che venivano costantemente monitorati in azienda. In tale periodo possiamo esaminare una prima fase, nella quale la probiosi non era stata ancora applicata nei broiler ed una seconda fase a partire dalla quale è stata introdotta in modo sistematico la probiosi.

Durante la prima fase tuttavia, la probiosi, in seguito applicata all'allevamento del broiler, stava comunque già dando ottimi risultati nell'ambito dell'allevamento dei riproduttori e delle ovaiole per uova da consumo allevati nell'ambito della stessa Azienda. Per i risultati ottenuti in queste tipologie rimandiamo all'abbondante letteratura che apparve in quegli anni pionieristici.

L'azienda produceva allora 2.500.000 di broiler ogni mese.

I pulcini di un giorno venivano schiusi in un unico incubatoio.

Gli ibridi allora allevati erano di diverse stirpi genetiche.

Anche la tipologia alimentare era divisa: una linea alimentare destinata a broiler di pigmentazione bianca ed una per broiler di pigmentazione gialla.

Gli allevamenti nei quali si svolgevano i singoli cicli produttivi (5 cicli annui per ciascun allevamento) erano i più eterogenei, vuoi dal punto di vista della ventilazione, ma anche della metratura, della conduzione etc..

Ciò rendeva possibile una corretta analisi di diverse metodologie di allevamento, profilassi e/o terapia solo se effettuata su "grandi numeri" e per "lungi periodi", ottenendo attraverso l'enorme quantità di dati raccolti una ineccepibile significatività statistica.

Tale tecnica analitica era stata più volte applicata in quanto ritenuta, in base alle numerose esperienze già effettuate, quella che meglio rappresentava la realtà.

A tale scopo è stata impostata una prova "preventiva" che dimostrasse almeno l'eventuale pareggio economico del trattamento in esame (ossia che dimostrasse che i benefici ottenuti ripagavano il maggior costo del metodo oggetto dello studio) e che aprisse le porte alla possibilità di una applicazione sistematica sulla totalità della azienda.

Il protocollo applicativo ha seguito il seguente schema:

Somministrazioni diverse di Batteri probiotici in ragione di  $10 \times 10^9$  UFC ogni 10.000 capi (broiler) indipendentemente dall'età degli animali.

1 singola somministrazione a 1 giorno di vita tramite spray a goccia grossa in incubatoio

1 somministrazione giornaliera per 4 giorni consecutivi in acqua di bevanda da consumarsi nel tempo di 1-2 ore (previo assetamento) al cambio del mangime (circa 15 giorni di vita).

1 eventuale somministrazione giornaliera per 4 giorni consecutivi in acqua di bevanda, da consumarsi nel tempo di 1-2 ore (previo assetamento) dopo ogni eventuale trattamento con farmaci antibiotici al fine di ripristinare la flora intestinale

Sono stati quindi previamente sottoposti a trattamento probiotico tutti i pulcini nati in una singola settimana (600.000 circa).

Tali animali hanno quindi proseguito il protocollo applicativo di cui sopra sino alla loro macellazione.

Alternativamente si sono quindi susseguite settimane dove i pulcini non hanno seguito il protocollo applicativo della probiosi a settimane nelle quali il protocollo è stato invece applicato.

Tale schema è stato seguito e monitorato per due mesi, ottenendo un numero considerevole di animali trattati con probiotici (2.400.000 circa) e di animali non trattati (2.400.000 circa).

Dopo tale prova “preliminare”, visti gli evidenti benefici ottenuti, il protocollo della probiosi è stato applicato in tutti gli animali (broiler) allevati.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 1 sono espsti alcuni risultati ottenuti dalla prova cosiddetta preliminare.

Tab. 1

N° animali	% mortalità	Peso Medio	Increment. Gr/die	I.C.A	note
355.450	9,4	2941	54,85	2,13	TRADIZIONALI
375.600	7,13	3017	55,06	2,07	PROBIOSI
<b>DELTA</b>	<b>- 2,27</b>	<b>+ 76</b>	<b>+ 0,21</b>	<b>- 0,06</b>	

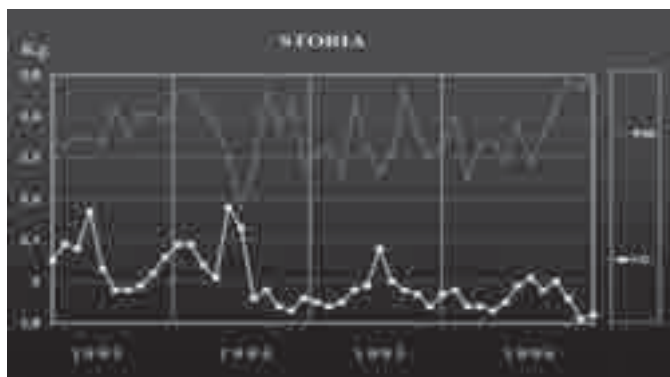
Tali risultati ci hanno permesso di stabilire la accettabilità, dal punto di vista economico, del metodo probiotico.

Di conseguenza si è incominciato ad utilizzarlo sulla totalità degli animali allevati.

Il periodo di inizio del metodo probiotico è stato la metà circa del 1994 e dall'anno successivo sono stati particolarmente evidenti i benefici ottenuti.

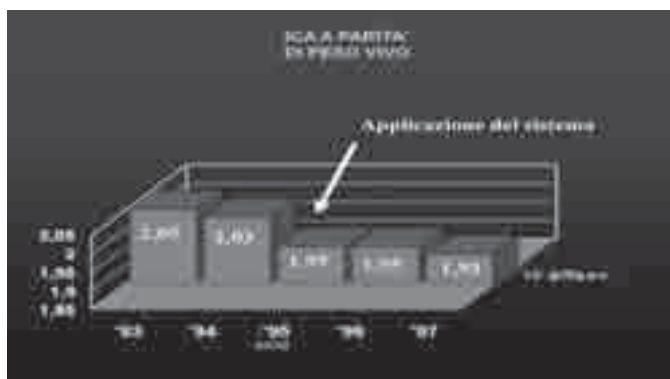
Nella tabella 2 sono evidenziati gli andamenti annuali degli indici di conversione alimentare (ICA) rispetto al peso medio della totalità degli animali allevati. Come si può facilmente osservare, dalla seconda metà del 1994 è evidente l'allineamento in basso (circa 40 grammi in meno) dell'ICA.

Tab. 2



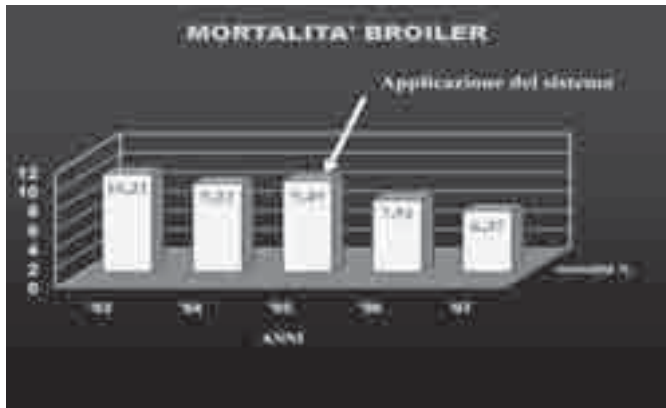
Nella tab. 3 è stato calcolato l'ICA medio annuale a parità di Peso Medio. La differenza col metodo di allevamento senza applicazione della probiosi sembra risultare ancora più evidente (da 80 grammi a 100 grammi meno!). Tuttavia in base ai risultati delle prove preliminari abbiamo ritenuto corretto non calcolare più di 40 grammi di ICA di beneficio ottenibile dal metodo probiotico, attribuendo l'ulteriore miglioramento dei risultati all'applicazione di contemporanee migliorie tecniche innovative.

Tab. 3

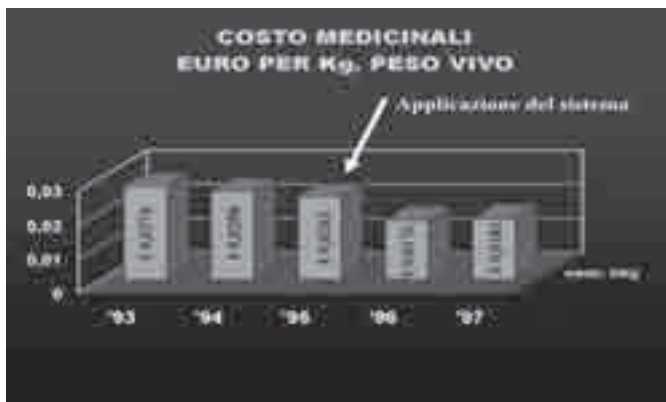


Il miglioramento dello stato sanitario degli animali allevati, evidenziabile dal dato della percentuale di mortalità media annuale (dato più che evidente) è tuttavia non completamente attribuibile alla probiosi messa in atto. Meglio detto: ci si è resi conto che l'applicazione di altri metodi innovativi sull'allevamento (programmi di buio ad es.) influenzavano maggiormente la vitalità delle razze allora allevate, in particolare nei soggetti di sesso maschile e di maggior peso medio. In alcune razze ciò era addirittura più evidente rispetto ad altre. In tal senso non ci sembra opportuno attribuire in toto l'abbassamento della percentuale di mortalità all'applicazione della probiosi.

Tab. 4



Più interessante a nostro avviso è il dato riguardante la riduzione della spesa relativa al farmaco terapeutico.

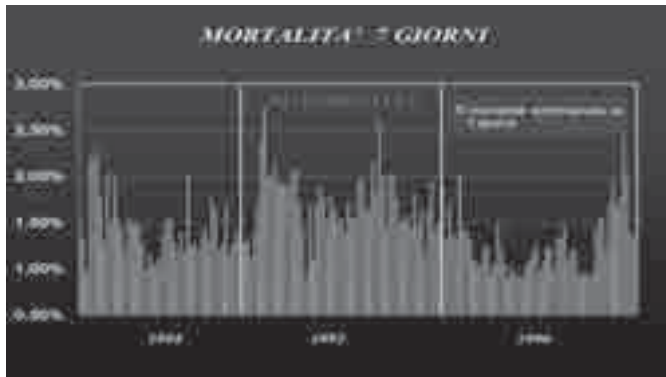


Tab. 5

Dalla tabella 5 è possibile vedere un drastico calo della spesa espressa in euro per Kg di peso vivo.

Nel 1995 il calo non si è manifestato in quanto mascherato da un anomalo incremento di casi di onfalite manifestatasi alla fine della prima settimana di vita dei pulcini (tab.6). Onfalite conseguente all'eliminazione della Formalina in incubatoio che venne sostituita da altri disinfettanti. Tale incremento della mortalità neonatale ha inevitabilmente provocato un sensibile aumento dell'utilizzo dei farmaci antibiotici necessari per contenere le infezioni.

Tab. 6



Più interessante è invece l'analisi della percentuale di cicli di allevamento esenti da trattamento antibiotico (tab.7).

Tab. 7

ANNO	N° TOTALE CICLI	N° CICLI TRATTATI CON ANTIBIOTICI	% DI CICLI TRATTATI	NOTE
1993	173	128	73,99%	dati raccolti solo da luglio
1994	323	315	97,52%	
1995	296	279	94,26%	
1996	373	301	80,70%	
1997	560	495	88,39%	

Con l'applicazione della probiosi nell'allevamento del broiler si è reso evidente ciò che in parte era già stato precedentemente osservato nelle galline produttrici di uova (da riproduzione e da consumo), ossia una maggior resistenza degli animali ad infezioni da germi di irruzione secondaria (E.coli ad es.) e comunque da germi con crescita a pH tendenzialmente basico (tab.8).



**CICLOTTA SATORICA A PHIPROBIS**

ORGANISMO	MINIMO	OTTIMALE	MAX.
Acidobacterium pasteurianus	—	6.0 - 7.0	8.3
Lactobacillus acidophilus	5.3 - 6.3	6.8 - 8.0	9.0 - 10.0
Propionibacterium shermanii	6.6 - 7.6	6.8 - 7.8	8.0 - 9.0
Bifidobacterium	6.0 - 8.0	6.0 - 7.0	8.0
Streptococcus	4.1	6.8 - 7.3	8.1

Tab. 8

Tale resistenza è facilmente attribuibile al mantenimento del pH ottimale dell'apparato digerente da parte di una flora microbica mantenuta in perfetto equilibrio anche grazie ad un apporto manuale (ma non artificiale) della stessa (tab.9)

Tab. 9

**ACIDITÀ NELLA APPARATO DIGERENTE**

settore	pH
goleto	4,57
proventricolo	4,4
stomaco muscolare	2,6
duodeno	5,76 - 6,01
diguno	5,78 - 5,9
ileo	6,27 - 6,43
retto	6,26
cieco	5,71

## CONCLUSIONI

Molti anni sono indubbiamente passati ma da allora la probiosi è stata un ulteriore aiuto per offrire un prodotto che ha potuto fornire risposte ad ogni richiesta da parte dei produttori e dei consumatori:

- animali più sani
- allevamento secondo natura
- riduzione dei trattamenti antibiotici
- riduzione dei costi di produzione

Si è voluto mettere a conoscenza di tutti questa esperienza vissuta, nella speranza di poter offrire un valido aiuto nell'obiettivo comune di migliorare la nostra tecnica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Bailey J.S.(1993). Control of Salmonella and Campylobacter in poultry production. A summary of work at Russel Research Center. Poultry Sci., 72,1169.
- 2) Castello M.C. (1997). La prima settimana di vita del pulcino. Giornata Trouw Nutr.. Madrid 1997
- 3) Castello M.C. (2002). Alcune considerazioni sul benessere negli allevamenti avicoli. Asti 21-03-2002
- 4) Castello M.C., Sega M. (2002). Use of lactobacillus spp. as probiotic in broiler breeder flocks. 41° Convegno SIPA. Forli, 2002
- 5) Giardini e coll. (2001), a. Batteri lattici e flora gastro-enterica. Rivista di avicoltura, 4, 8.
- 6) Giardini e coll. (2001), b. Esclusione competitiva e batteri lattici. Rivista di avicoltura, 5, 40.
- 7) Giardini e coll. (2001), c. Batteri lattici, un mondo da conoscere . Rivista di avicoltura, 2, 12.
- 8) Giardini e coll. (2001), d. Tassonomia e habitat dei batteri lattici. Rivista di avicoltura, 5, 40.
- 9) Giardini e coll. (2001), e. La probiotica con i batteri lattici. Rivista di avicoltura, 6, 14.
- 10) Guillot J.F., Ruckebusch Y. (1994). Microflore digestive des animaux. In: ( De Roissart H. e Luquet F.M. ) "Bactéries lactiques", vol.II, Lorica, Paris, 343.
- 11) Rantala M., Nurmi E. (1973). Prevention of the growth of Salmonella infantis in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. Br. Poult. Sci., 14, 627.
- 12) Sarra P.G., Badini C. (1998). Performance zootecniche di pulcini e trattamenti probiotici. Rivista di Avicoltura, 3, 41.
- 13) Tannock G.W. (1994). The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. In: (Gibson A.W.) "Human heath: the contribution of microorganisms". Springer-Verlag, London, 1.

## **ANALISI DEI CEPPI CIRCOLANTI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* MEDIANTE L'UTILIZZO DI METODICHE BIOMOLECOLARI.**

Catania S., Battanolli G., Baldasso E., Fincato A., Rodio S., Iob L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)*

### **Summary**

*Mycoplasma synoviae* (MS) is considered an important cause of economic loss in the poultry industry. Respiratory and articular diseases are usually associated to MS infection causing high condemnation rates. The biomolecular methods permit to study some specific genes in order to evidence specific change in the DNA sequencing. Recently, some Authors report a classification of MS based on the sequencing of *vlhA* gene that encoded for the variable lipoprotein VlhA, an abundant immunodominant surface lipoprotein [5]. This protein is characterized by an N-terminal conserved region existing in single copy of which sequence shows high variability among strains. Gene sequence contains tandem repeats that encode proline-rich repeats (PRR) and also a region that is highly polymorphic (RIII) [1]. The aim of this report is to study the *vlhA* genotype of *Mycoplasma synoviae* recently isolated in our lab. A total of 338 MS were submitted for the *vlhA* study and we obtain 303 sequences. Our results showed an high presence of genotype D and F in the poultry industry.

### **INTRODUZIONE**

Il *Mycoplasma synoviae* (MS) rappresenta uno dei più importanti micoplasmi in ambito avicolo. Il suo ruolo patogeno è principalmente localizzato nel settore da carne dove causa importanti danni economici, dovuti ad un incremento di scarti al macello ed un decremento degli indici di conversione. Inoltre recentemente l'MS è stato correlato, in diverse nazioni inclusa l'Italia, ad una specifica alterazione del polo apicale del guscio nella gallina ovaiole [1,3].

Lo studio della classificazione dei patogeni, attraverso differenti metodologie, ha permesso a seguito di correlati studi epidemiologici di evidenziare specifici tipi o sottotipi responsabili di forme cliniche più o meno evidenti. Anche se nel settore micoplasmi non siamo giunti a tali traguardi la possibilità di distinzione dei genotipi rappresenta un ottimo punto di partenza. In particolare recentemente la lesione apicale del guscio è stata relazionata principalmente ad uno specifico genotipo [2] permettendo di chiarire alcune discrepanze dovute principalmente ad una elevata incidenza di gruppi di ovaiole MS positivi contro una minore prevalenza di gruppi produttori di uova alterate.

Tale esempio ha sempre più stimolato la nostra attività in questo settore focalizzando la nostra attenzione nella studio dei differenti genotipi attualmente circolanti. Scopo del presente lavoro è quello di studiare i differenti genotipi di MS circolanti nel territorio nazionale.

### **MATERIALI E METODI**

338 estratti di DNA sono stati sottoposti a successiva PCR, seguendo le indicazioni

descritte da Hammond *et al.* [4] con alcune modifiche.

Al termine della reazione di PCR, i prodotti sono stati visualizzati con corsa in gel di acrilamide al 7% e successivamente inviati al sequenziamento.

Le sequenze prodotte, in totale 303, sono state allineate con il software MEGA® utilizzando come riferimento le sequenze elencate da Hammond *et al.*[4]. L'allineamento è avvenuto in due momenti: classificazione del genotipo tramite allineamento del PRR, valutazione della lunghezza e dell'identità rispetto alle sequenze già presenti, infine solo per i campioni risultati di tipo C, è stato assegnato il sottotipo controllando l'identità della sequenza RIII rispetto a quelle già postate.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Su di un totale di 338 estratti positivi ad MS provenienti dal territorio italiano sono stati sequenziati ben 303 campioni, tale differenza è principalmente dovuta al fatto che in alcuni casi non è stato possibile ottenere una sequenza valida a causa della qualità del DNA prodotto mentre in altri casi la presenza di differenti bande, e quindi possibilmente di due differenti ceppi, non ha permesso il sequenziamento.

Di queste, alcune per un totale di 127 sequenze risultavano appartenere ai medesimi allevamenti e sono state utilizzate al fine di valutare il possibile mantenimento del genotipo all'interno dell'insediamento. Dai dati da noi ottenuti in tutti gli allevamenti testati, ad eccezione degli insediamenti *multi-age*, il genotipo ritrovato risulta essere sempre il medesimo all'interno del singolo capannone e negli altri capannoni, anche con tempistica differente. Inoltre in laboratorio abbiamo eseguito alcune prove con passaggi seriali dimostrando il mantenimento del medesimo genotipo.

I rimanenti 176 campioni corrispondono a differenti insediamenti zootecnici nei quali abbiamo dimostrato la presenza di diversi genotipi quali C, D, E, F, G, H. Il genotipo maggiormente frequente è risultato essere il D con una percentuale del 44% seguito dal genotipo F (40%) ed infine il C (23%), i rimanenti tre genotipi presentano percentuali dell'1% ciascuno.

All'interno della varie categorie produttive si sono notate alcune differenze riguardati la presenza dei vari genotipi in particolare sembra che il genotipo F sia maggiormente presente nel settore da ingrasso ed ovaioia mentre il settore riproduttore presenti una maggiore presenza del genotipo D.

Tali dati sono di sicuro stimolo per ulteriori studi volti ad individuare la prevalenza dei vari genotipi nelle differenti categorie produttive, ed inoltre evidenziano che oggi può essere possibile distinguere anche se per un solo gene, il *Mycoplasma synoviae*.

Tale opportunità potrà aiutare a chiarire la diffusione e l'epidemiologia di tale patogeno nel settore avicolo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. Avian Dis. 2010 Jun;54(2):961-4.
2. Catania S., Ramirez A. S., Fasolato M., Brustolin M., Battanoli G., Bradbury J. Demonstration of two different strains of *Mycoplasma synoviae*

- in tracheal and oviduct specimens on a chicken layer farm affected by Eggshell Apex Abnormalities. XVII Congress of WVPA (World Veterinary Poultry Association). Cancun Mexico 14-18 August 2011 pag. 163
3. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.*38(1):77-85.
  4. Hammond PP, Ramírez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene vlhA and its value for strain typing. *Vet Microbiol.* 2009 Apr 14;136(1-2):61-8. Epub 2008 Nov 1.
  5. Hong Y, García M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene vlhA. *Avian Dis.* 2004 Sep;48(3):606-16.

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole.***

## **APPLICAZIONI DI METODICHE BIOMOLECOLARI PER LA DIFFERENZIAZIONE GENOTIPICA IN *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*.**

Catania S., Battanoli G., Rodio S., Quattieri K., Baldasso E., Iob L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)*

### **Summary**

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) is considered the most important mycoplasma species in the poultry production. Its pathogenic role is related to an important respiratory syndrome, that could be complicated with other avian pathogens. All productive categories can be affected with important production losses. In particular, in breeders a drop in eggs' laying rate and a mild increase of mortality rate are reported. In order to contain the clinical disease different live vaccines are used, mainly in layer and breeders sector, to prevent the transmission and reduce the impact of the MG infections.

Developing a sensitive tool, able to differentiate the MG strains is of great interest to control its spread in poultry industry.

The aim of this study was to characterize the gene coding for the cythadesin protein *Mgc2* and to assess a sensitive method for the differentiation of MG strains. 156 field samples originating from commercial turkey and chickens were investigated. Moreover the MG vaccine strains 6/85 [1] and ts-11 [5], and the reference strains ATCC (Strain 15302-S6) and NCTC (Strain 10115), were included in the study.

Our result showed that *Mgc2* gene can differentiate between strains, through the variability of the nucleotide sequence. These preliminary results allowed improving the diagnosis and giving a chance for the molecular genotyping of MG.

### **INTRODUZIONE**

Il *Mycoplasma gallisepticum* provoca nel pollo e nel tacchino una forma respiratoria piuttosto severa con coinvolgimento delle vie aeree superiori ed interessamento dei seni e conseguente sinusite (in particolare nel tacchino). Negli animali in deposizione si manifesta un importante calo della deposizione di uova correlata anche ad una decolorazione delle stesse. Attualmente i piani di contenimento prevedono la produzione di gruppi MG *free* e l'applicazione di misure di biosicurezza. Tali accorgimenti però in alcuni casi non risultano essere efficaci. Infatti in alcune categorie produttive ed in determinate aree geografiche l'utilizzo di vaccini permette il contenimento delle forme cliniche.

Scopo del presente lavoro è quello di valutare se le metodiche biomolecolari disponibili possono essere utilizzate al fine di differenziazione dei ceppi MG circolanti. A tale fine ci siamo proposti di focalizzarci su il gene *mgc2* che codifica per una proteina "cythadesin", nei campioni conferiti presso il nostro laboratorio.

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 156 campioni di campo provenienti da allevamenti avicoli industriali e qualche campione di provenienza del settore rurale. La procedura di isolamento è stata effettuata sulla base di una nostra procedura interna. Oltre ai ceppi di campo abbiamo utilizzato anche i ceppi MG vaccinali 6/85 [1], e TS-11 [4], ed alcuni ceppi di riferimento ATCC (Strain 15302, S6) and NCTC (Strain 10115).

Estrazione DNA: Il DNA genomico dei campioni isolati è stato estratto e purificato utilizzando il kit d'estrazione "Bacterial Genomic Miniprep" (Sigma-Aldrich) seguendo le istruzioni riportate.

PCR: la reazione a catena della polymerase è stata sviluppata amplificando una regione di circa 300 pb del gene *mgc2* [2] con sequenza nucleotidica assegnata NC\_004829 e locus tag MGA\_0932, codificante per una proteina adesina Mgc2/P32 [3].

I prodotti di amplificazione sono visualizzati in un gel di acrilammide al 7% mediante colorazione con Sybr Gold (Invitrogen) per la visualizzazione agli UV. I campioni positivi per MG sono sequenziati e analizzati mediante allineamento con software MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I 156 campioni sottoposti ad analisi provenivano da 115 differenti *outbreaks*. 70 campioni infatti provenivano da specifici allevamenti in cui erano stati campionati diversi capannoni anche con tempistiche differenti, al fine di valutare il mantenimento del genotipo nel medesimo *outbreak*. I nostri risultati mostrano che all'interno dell'allevamento il genotipo *mgc2* si mantiene costante così come in laboratorio dopo alcuni passaggi seriali *in vitro*.

Dai 115 campioni provenienti da 115 differenti focolai di infezione abbiamo potuto osservare 10 differenti genotipi da noi denominati con differenti colori in attesa di una denominazione ufficiale. Tra i genotipi da noi dimostrati abbiamo notato una netta prevalenza di tre specifici genotipi ed in particolare il Light-blue, Pink e Grey con una presenza percentuale del 34%, 30% e 21% rispettivamente.

I ceppi vaccinali testati 6/85 e TS-11 sono stati classificati nei gruppi Orange e Pink rispettivamente, mentre i ceppi di riferimento 15302, (S6) ed il 10115 come Green e Violet.

I dati da noi riportati dimostrano la possibilità di differenziazione biomolecolare all'interno della specie *Mycoplasma gallisepticum*, naturalmente ulteriori studi sono necessari per cercare di valutare se possono esistere specifiche correlazioni tra genotipo e sintomatologia clinica. Sicuramente abbiamo uno strumento aggiuntivo per lo studio dell'epidemiologia di tali particolari microrganismi. Tale metodica fornisce valide basi per il miglioramento della diagnosi e il controllo della diffusione dell'infezione da *M. gallisepticum* che una volta individuata può essere correttamente gestita.

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole.***

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Evans, R. D. & Hafez, Y. S. (1992). Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Dis* 36, 197-201.
- [2] García M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH. (2005) Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens.. *Avian Dis*. Mar;49(1):125-32.
- [3] Papazisi L, Gorton TS, Kutish G, Markham PF, Browning GF, Nguyen DK, Swartzell S, Madan A, Mahairas G, Geary SJ. (2003) The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R(low). *Microbiology*. Sep;149(Pt 9):2307-16.
- [4] Saif Y. M. et al. (2008) Disease of poultry, 12th ed. *Wiley-Blackwell*.
- [5] Whithear, K. G. Soeripto, Harrigan K. E. & Ghiocas, E. (1990). Immunogenicity of a temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J* 67, 168-174.



## **MYCOPLASMA IOWAE IN TACCHINI DA CARNE: VALUTAZIONI CLINICHE E ANATOMOPATOLOGICHE.**

Catania S., Fincato A., Flaminio B., Santone C., Rodio S., Iob L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italy; [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)*

### **Summary**

*Mycoplasma iowae* (MI) is considered an important cause of economic loss in the poultry industry in particular in the turkey sector. Its pathogenic activities has been mainly related to decrease of hatchability because of late embryo death. Moreover some Authors reported bone abnormalities and a stunting syndrome in chicken and turkey pullets, experimentally infected with MI. Recently in the USA some MI clinical cases have been reported in meat turkey, demonstrating a correlation between leg abnormalities and arthrosynovitis with MI infection.

In this report we would like to share the clinical and gross-pathological scenario related to *Mycoplasma iowae* outbreaks in several commercial turkey flocks during the last year.

### **INTRODUZIONE**

Il *Mycoplasma iowae* (MI) era considerato un patogeno di particolare importanza nel settore tacchino e la sua attività patogena era principalmente correlata ad un incremento della mortalità embrionale. Al fine di contenere tali problematiche si è deciso il risanamento dei gruppi di riproduttori infetti, generando linee *Mycoplasma iowae* free. La sua scarsa prevalenza nel settore tacchino, congiuntamente con l'assenza di *report* riguardanti tale specie di micoplasma, ha fatto sì che l'attenzione nei riguardi di tale specie diminuisse con conseguente scarso sviluppo di nuove metodiche diagnostiche e poca attenzione dal punto di vista clinico.

E' bene ricordare che mediante infezioni sperimentali, eseguite sia su tacchino che su pollo. l'MI ha determinato uno scarso accrescimento, con evidenti alterazioni dello sviluppo osseo, oltre a forme di lieve aerosacculite, artrosinovite ed anomalità del piumaggio.

Recentemente negli Stati Uniti sono stati segnalati alcuni casi di isolamento di MI in tacchini da carne che manifestavano anomalità scheletriche e condrodistrofia [3]. Inoltre durante il 2012 in Italia è stato segnalato l'isolamento di MI in tacchini industriali [2].

Scopo del presente lavoro è discutere la sintomatologia clinica e le alterazioni anatomopatologiche rilevate in diversi gruppi di tacchini da carne nel territorio italiano in cui è stato isolato il *Mycoplasma iowae*.

### **MATERIALI E METODI**

Diverse carcasse, provenienti da 50 differenti gruppi di tacchini da carne con sospetto di *M. iowae* sono state analizzate presso il nostro laboratorio nel periodo tra settembre 2011 e giugno 2012. Agli animali conferiti veniva applicato un protocollo diagnostico *standard* sulla base delle note anamnestiche, sintomatologia e lesioni anatomopatologiche. Tale protocollo prevedeva un accurato esame necroscopico ed

accertamenti volti ad evidenziare la presenza di altri agenti patogeni tipici di tale specie quali esami batteriologici, parassitologici e virologici ed inoltre l'isolamento di micoplasmi da differenti matrici quali intestino, rene, e trachea. Brevemente il protocollo di isolamento micoplasma prevede una arricchimento in fase liquida (Mycoplasma Experience Broth®) incubato a 37°C al 5% CO<sub>2</sub> per almeno 15 giorni ed una seconda fase in agar (Mycoplasma Experience Agar®). I brodi inoculati venivano valutati giornalmente al fine di evidenziare eventuali attività metaboliche e in caso di positività il brodo veniva sub inoculato in agar ed un'aliquota veniva processata con il metodo DGGE [1]. I campioni che non manifestavano positività al 15° giorno venivano sub coltivati in agar e mantenuti per ulteriori 15 giorni e in caso di assenza di crescita il campione veniva considerato negativo. Le colonie riferibili a micoplasmi venivano ulteriormente identificate mediante immunofluorescenza.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

I gruppi degli animali conferiti manifestavano sintomatologia clinica, rappresentata da lieve forma respiratoria ed enterica intorno alle 2 settimane di vita, successivamente si aveva un incremento degli scarti e la presenza di alterazione della deambulazione con animali deboli, alterazioni nella conformazione delle zampe, tale sintomatologia si aggravava con il passare del tempo e non sembrava rispondere alle comuni terapie. In alcuni gruppi è stato rilevato un aumento delle fratture spontanee e gravi deformità delle zampe.

All'esame anatomopatologico nei soggetti di età inferiore alle 4 settimane è stata rilevata la presenza di una lieve aerosacculite di aspetto schiumoso, enterite e rotazione del metatarso e in alcuni casi accorciamento dello stesso. Negli animali di età superiore alle 4 settimane le lesioni osteoarticolari risultavano essere maggiormente evidenti con curvatura del femore e della tibia, alterazione della colonna vertebrale ed in alcuni rari casi collo a S ed artrosinoviti.

Gli esami condotti hanno dimostrato solamente in alcuni gruppi di animali la presenza a livello intestinale di coccidi, protozoi flagellati ed *Astrovirus* e *Rotavirus*. senza peraltro manifestare una stretta correlazione tra questi riscontri laboratoristici e lesioni anatomopatologiche, e/o manifestazioni cliniche.

In tutti i gruppi esaminati abbiamo potuto isolare il *Mycoplasma iowae* da campioni di intestino sia prossimale che distale, inoltre un rilievo costante è stata la dimostrazione della presenza dell'MI in tessuto renale, mentre l'apparato respiratorio è risultato essere positivo per MI solamente in alcuni casi.

I dati fin qui riportati dimostrano la presenza del *Mycoplasma iowae* nel settore tacchino da carne in Italia, che risultava essere assente da almeno 30 anni nel nostro territorio.

La sintomatologia clinica ed il quadro anatomopatologico risulta essere compatibile con le lesioni riscontrate in corso di infezione sperimentale da MI, inoltre presentano alcune caratteristiche comuni con il recenti report statunitensi [3,4]. In particolare abbiamo potuto notare una sovrapposibilità riguardante le lesioni ossee da noi riportate con quelle riportate da Ley et al 2010, anche se il rilievo del collo ad S è risultato essere sporadico e con una incidenza molto bassa. Inoltre nei casi da noi studiati abbiamo rilevato solamente in pochissimi soggetti la presenza di artrosinoviti, da cui inoltre è stato dimostrato l'MI, mentre altri autori [4] riportano un caso in cui la forma articolare era il segno clinico ed anatomopatologico prevalente.

Sicuramente ulteriori studi volti a chiarire il ruolo di tale micoplasma nel settore tacchino da carne sono necessari, anche se è importante ricordare che rispetto a 30 anni fa, quando l'MI era presente nel settore tacchino molte cose sono cambiate tra cui la genetica del tacchino che risulta essere maggiormente performante e produttiva, il management dell'allevamento ed anche il regime alimentare che non preve più l'utilizzo di fonti proteiche di origine animale. Tutti questi fattori, congiuntamente alle caratteristiche opportunistiche tipiche dei micoplasmi, potrebbero aver contribuito alle attuali manifestazioni cliniche nel tacchino da carne.

In conclusione sulla base dei seguenti dati risulta opportuno inserire tra le diagnosi differenziali in corso di specifiche manifestazioni cliniche nel tacchino da carne anche la ricerca del *Mycoplasma iowae*, dato che il monitoraggio volto solamente al controllo degli incrementi di schiudibilità non sembra avere grande efficacia nell'evidenziazione dell'infezione. Infine esortiamo l'incremento del controllo dei gruppi di riproduttori all'ingresso anche per tale specie di micoplasma al fine di evitare l'ingresso ed il mantenimento di gruppi positivi.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Battanoli G., Brustolin M., Bilato D., Gobbo F., Quattieri K., McAuliffe and Catania S. Utilizzo della DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) per l'identificazione delle specie di micoplasmi in campo avicolo. XII Congresso Nazionale SIDILV. Genova 27-29 Ottobre 2010. pag 63-64.
2. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Fincato A, Battanoli G, Iob L. Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. Vet Rec. 2012 Jan;170(4):107-8.
3. Ley D.H., Marusak R.A., Vivas E.J., Barnes H.J., Fletcher O.J. (2010). *Mycoplasma iowae* associated with chondrodystrophy in commercial turkeys. Avian Pathol. Apr; 39 (2): 87-93. Erratum in: Avian Pathol. 2010 Aug; 39 (4): 307.
4. Trampel DW, Goll F Jr. Outbreak of *Mycoplasma iowae* infection in commercial turkey poults. Avian Dis. 1994 Oct-Dec;38(4):905-9.

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole.***

# **EVIDENZE SPERIMENTALI DELLA RESISTENZA DEL PICCIONE (*COLUMBA LIVIA*) ALL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* E DELLA SUA IRRILEVANZA NELLA TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE AL TACCHINO**

Catelli E.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Marziali A.<sup>1</sup>, De Matteo P.<sup>1</sup>, Naylor C.J.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna - Via Tolara di Sopra, 5. 40064 Ozzano Emilia (BO) – ITALIA*

<sup>2</sup>*Department of Infection Biology Institute of Infection and Global Health - Faculty of Health and Life Sciences, Leahurst Campus, University of Liverpool CH64 7TE - UK*

<sup>3</sup>*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16. 35020 Legnaro (PD), ITALIA*

## **Summary**

Avian metapneumovirus (AMPV) causes an upper respiratory tract infection in turkeys leading to turkey rhinotracheitis. In other avian species, including chickens, it is also involved in the etiology of multifactorial diseases such as swollen head syndrome. Sensitivity of wild birds to AMPV and their role in maintaining and spreading the virus to poultry is still a matter of debate. Recently the sensitivity of pigeons to AMPV of subtype A or B has been claimed, based on very limited PCR detections from wild or experimentally infected birds. In order to have conclusive evidence regarding the sensitivity of pigeons to AMPV of subtype B and its role in spreading the virus to turkeys, two experimental trials were planned in secure isolation conditions. In trial 1 two isolators were modified to host turkeys and pigeons in the same environment, separated only by a net. Drinkers were shared between groups. Pigeons were infected with AMPV and housed in one isolator with naïve turkeys. Similarly turkeys were infected and housed with naïve pigeons. Additional turkeys and pigeons were kept in different isolators as uninfected controls. Post-infection clinical signs, virus shedding and immune response were assessed for three weeks. In trial 2, commercial two-weeks old turkeys were divided in two groups and housed in two different isolators. Birds in isolator A were challenged as previously described. Four days post-infection, 7 weeks old naïve pigeons were introduced in the isolator A and kept with the infected turkeys for 24 hours, then removed, sprayed with 0,5 % of Virkon S® solution. After 10 minutes, pigeons were rinsed with water, dried, and introduced in the isolator B, where 10 naïve turkeys were housed. Clinical sign were monitored for 10 days. Pigeons were found refractory to AMPV experimental infection and neither able to spread the virus to naïve turkeys. Our paper shows that pigeons are highly unlikely to play any relevant role in the environmental spread of subtype B AMPV. Pigeons are not biological vector or reservoir species for AMPV subtype B.

## **INTRODUZIONE**

In che misura specie di volatili diverse da tacchino, pollo, fagiano e faraona siano sensibili al Metapneumovirus aviare (AMPV) sottotipo A e B, e che ruolo abbiano gli uccelli selvatici nel mantenere e diffondere l'infezione nell'ambiente, sono argo-

menti ancora oggetto di studio ed approfondimento da parte della comunità scientifica. La prima comparsa del virus in Sud Africa e la sua successiva diffusione in Israele ed Europa hanno avuto modalità che fanno sospettare che gli uccelli migratori, e gli uccelli selvatici in generale, abbiano giocato un ruolo importante nella trasmissione dell'infezione (Jones, 1996). Gli studi epidemiologici sulla diffusione di AMPV sottotipo A e B negli uccelli selvatici, se paragonati a quelli svolti in USA sul sottotipo C, sono scarsi e riportano una limitata presenza dell'infezione. Studi pubblicati negli anni '90 riportano l'evidenza di anticorpi nei riguardi di questi sottotipi in allevamenti di struzzi dello Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994) ed in gabbiani della costa Baltica in Germania (Heffels-Redman *et al.*, 1998). Più recentemente uno studio brasiliano riporta l'evidenza di RNA virale di AMPV in uccelli selvatici tenuti in cattività (Felippe *et al.*, 2011). Un'ampia indagine epidemiologica svolta nel 2004 in zone paludose dell'Italia nord-orientale, ha riportato al contrario costantemente negatività sia sierologiche che molecolari per infezione da AMPV sottotipo A e B in molte specie di uccelli acquatici (Delogu *et al.*, 2004). L'anatra, l'oca ed il piccione sono risultati resistenti all'infezione sperimentale con AMPV sottotipo A (Gough *et al.*, 1988); mentre l'anatra muta sia all'infezione con AMPV A che B (Toquin *et al.*, 2006).

Il coinvolgimento del piccione nella diffusione di AMPV sottotipo A e B è stato recentemente nuovamente sospettato, sulla base di scarse positività molecolari evidenziate in piccioni selvatici o infettati sperimentale (Felippe *et al.*, 2011; Gharaibeh & Shamoun, 2011). Il presente lavoro ha avuto come obiettivi da un canto determinare con certezza la sensibilità del piccione ad AMPV sottotipo B e dell'altro verificare la sua rilevanza nel trasmettere l'infezione al tacchino. A tale scopo sono state svolte prove due sperimentali in isolamento biologico.

## MATERIALI E METODI

### *Prova sperimentale n. 1*

39 tacchini da carne di una settimana di vita e 45 piccioni di 7 settimane di vita sono stati divisi in 6 gruppi ed accasati in 4 isolatori per pollame. Due isolatori (A e B) sono stati previamente modificati in modo tale che in ciascuno potessero essere ospitati, nello stesso ambiente e separati solo da una rete, un gruppo di tacchini ed uno di piccioni. In questi isolatori gli abbeveratoi erano in comune. Negli altri due isolatori erano alloggiati rispettivamente il gruppo dei tacchini (T) e dei piccioni (P) di controllo.

Il primo gruppo di 13 tacchini (TI) è stato sottoposto ad infezione sperimentale tramite goccia nell'occhio con il ceppo AMPV sottotipo B It/Ty/Vr240/87. L'operazione è stata svolta in una stanza separata e solo successivamente il gruppo è stato alloggiato nell'isolatore A assieme a 16 piccioni non infetti (PC). Analogamente 16 piccioni sono stati infettati (PI) e successivamente alloggiati nell'isolatore B con 13 tacchini non infetti (TC).

Questa procedura è stata utilizzata per evitare che l'ambiente degli isolatore in cui le due specie erano alloggiate assieme fosse contaminato durante l'infezione sperimentale.

La dose infettante è stata di  $3,7 \log_{10} \text{CD}_{50}$  in entrambi i casi. Dal primo all'11° giorno

post-infezione gli animali sono stati osservati quotidianamente per eventuale insorgenza di sintomatologia clinica riferibile ad AMPV. E' stato assegnato un punteggio a ciascun animale a seconda della gravità della sintomatologia clinica: **0** nessun sintomo; **1** scolo nasale limpido; **2** scolo nasale torbido; **3** rigonfiamento dei seni infraorbitali e/o essudato schiumoso oculare (Naylor & Jones, 1994). La normalità della distribuzione campionaria è stata prima valutata mediante il test Kruskal–Wallis non-parametric one-way ANOVA.

I confronti fra i gruppi sono stati condotti utilizzando il test U di Mann–Whitney. Da 10 soggetti per gruppo, nei giorni 0, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 14 e 16 post infezione sono stati raccolti tamponi rino-faringei allo scopo di valutare l'eliminazione virale di AMPV mediante Real time RT-PCR (RRT-PCR) per AMPV sottotipo A e B specifica (Cecchinato *et al.*, 2012). Allo stesso modo sono stati analizzati per presenza di RNA virale, alcuni campioni dell'acqua di bevanda condivisa fra piccioni e tacchini negli isolatori A e B, raccolti ai giorni 4 e 5 post infezione. Inoltre, nei giorni 3, 5 e 7 post-infezione sono stati sacrificati due piccioni dai gruppi PC e PI ed un tacchino dai gruppi TI e TC; un piccione e un tacchino dai gruppi di controllo. Al fine di determinare la distribuzione virale di AMPV in alcuni tessuti target sono stati prelevati da questi animali e sottoposti a RRT-PCR per AMPV campioni di congiuntiva, turbinati nasali, trachea e ghiandola di harder. Esami sierologici per AMPV sono stati eseguiti da 10 soggetti per gruppo ai giorni 0 e 21 post-infezione mediante un kit ELISA blocking del commercio (Avian Pneumovirus SVANOVIR®, Svanova). Tale test permette di evidenziare anticorpi indipendentemente dalla specie in esame.

### *Prova sperimentale n. 2*

20 tacchini da carne di due settimane di vita sono stati divisi in due gruppi ed alloggiati in due isolatori per pollame. Il gruppo alloggiato nel primo isolatore è stato sottoposto ad infezione con AMPV come descritto nella prova sperimentale 1. A 4 giorni dall'infezione, nel momento in cui la carica virale eliminata nell'ambiente dai tacchini infetti è massima, sono stati introdotti nell'isolatore 5 piccioni di 7 settimane di vita e tenuti a contatto con i tacchini infetti. Dopo 24 ore i piccioni sono stati rimossi, aspersi con una soluzione virulicida di Wirkon S® 0,5 % allo scopo di inattivare ogni traccia di virus dalla superficie esterna dei soggetti. Dopo 10 minuti i piccioni sono stati sciacquati con abbondante acqua pulita, accuratamente asciugati, e quindi introdotti nel secondo isolatore dove era alloggiato il secondo gruppo di 10 tacchini rimasti non infetti. Tacchini e piccioni sono stati allevati assieme per 10 giorni, durante i quali quotidianamente veniva valutata la sintomatologia clinica secondo il metodo descritto nella prova precedente.

## **RISULTATI**

### *Prova sperimentale n. 1*

Nelle figure 1 e 2 sono riportate le medie giornaliere della sintomatologia clinica osservate nei gruppi sperimentali. I tacchini sottoposti a infezione sperimentale hanno mostrato un andamento della sintomatologia clinica tipico dell'infezione da AMPV, con differenze statisticamente significative rispetto a tutti gli altri gruppi sperimen-

tali. I piccioni infettati sperimentalmente con AMPV hanno mostrato una lievissima sintomatologia non differente in modo statisticamente significativo da quella osservata nei piccioni tenuti a contatto con i tacchini infetti o nei piccioni di controllo. Nella tabella 1 sono riportati i risultati dell'eliminazione virale nei gruppi sperimentali. I tacchini infetti hanno eliminato il virus, come prevedibile, sino all'11° giorno post-infezione. I piccioni tenuti in contatto con questi, nell'isolatore A, sono risultati positivi ugualmente ma in numero minore e per un periodo più breve. L'RNA virale è stato evidenziato nell'acqua da bere condivisa fra questi due gruppi. Interessante notare che, se si va a valutare la quantità di virus rinvenuta nei tamponi rinofaringei, si evidenzia nei tacchini una quantità di virus di 3.000 volte superiore a quella rinvenuta dai piccioni. Non si è mai avuta ri-eliminazione virale nei piccioni infettati sperimentalmente e tanto meno nei tacchini posti a contatto con essi o nell'acqua di bevanda condivisa fra questi due gruppi. La distribuzione del virus nei tessuti (Tabella 2) ha avuto un andamento che riflette l'eliminazione virale nei tamponi: il virus è stato evidenziato costantemente nei tacchini infettati sperimentalmente, ed in un campione di trachea di un piccione del gruppo in contatto con questi. Anche in questo caso la quantità di virus evidenziata nel piccione è risultata essere molto bassa. Sempre negativi per AMPV sono risultati i tessuti sia dei piccioni infettati sperimentalmente che dei tacchini tenuti in contatto con essi. I piccioni sono risultati negativi sierologicamente per AMPV sia prima che dopo l'infezione sperimentale, mentre tutti i tacchini sono risultati sempre positivi, probabilmente anche per la presenza della immunità materna.

#### *Prova sperimentale n. 2*

Non sono stati osservati mai sintomi clinici nel gruppo di tacchini sensibili tenuti per 10 giorni con piccioni precedentemente messi in contatto per 24 ore con tacchini infettati sperimentalmente.

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

I risultati della prima prova hanno mostrato che il piccione non è sensibile alla infezione sperimentale con AMPV alla dose di  $3,7 \log_{10}$ . Gli animali non hanno infatti mostrato sintomi clinici né risposta immunitaria specifica, e non si è avuta né eliminazione virale respiratoria, né diffusione del virus nei tessuti target esaminati.

Quando invece i piccioni sono stati tenuti in stretto contatto con tacchini infettati sperimentalmente, è stato possibile evidenziare tracce di RNA virale nei tamponi rinofaringei e nella trachea di un soggetto. Tali positività sono probabilmente da considerarsi l'esito del contatto dei piccioni con l'acqua di bevanda contaminata dai tacchini. Anche il gruppo di piccioni contatto, analogamente al gruppo infettato sperimentalmente, non ha mostrato sintomi clinici né sieroconversione.

I risultati della seconda prova sperimentale hanno confermato questi risultati. E' stato infatti dimostrato che piccioni tenuti in stretto contatto con tacchini infetti non sono in grado di trasmettere l'infezione a tacchini sensibili.

In conclusione si può affermare che i piccioni non sono sensibili all'infezione con AMPV sottotipo B. I nostri risultati confermano quanto già affermato per AMPV sottotipo A da Ghouse *et al.* (1988). I piccioni si possono contaminare quando tenuti

a contatto per lunghi periodi con tacchini infetti ma, se spostati dall'ambiente contaminato e messi in contatto con tacchini sensibili, non sono in grado di trasmettere a questi ultimi l'infezione. Il nostro lavoro dimostra che è davvero improbabile che il piccione giochi un ruolo rilevante nella diffusione di AMPV sottotipo B. Il piccione non è quindi vettore biologico né tanto meno specie reservoir per AMPV sottotipo B. Saranno necessari ulteriori studi per definire se esistano specie selvatiche reservoir per AMPV sottotipo A e B, e quali esse siano.

## BIBLIOGRAFIA

Cadman HF, Kelly PJ, Zhou R, Davelaar F and PR Mason (1994). A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Diseases* 38(3): 621-625.

Cecchinato M, Lupini C, Munoz Pogoreltseva OS, Listorti V, Mondin A and E Catelli (2012). Development of a one-step real time RT-PCR assay for the detection, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtype A and B. VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. Rauschholzhausen, Germany, 18-21 June 2012.

Delogu M, De Marco MA, Catelli E, Cecchinato M, Sperati RL, Pesente P and C Franciosi (2004). Molecular and serological survey of avian pneumovirus infection in wild aquatic birds in Italy. Proceedings of the IV. International symposium on avian corona and pneumovirus infections. Rauschholzhausen, Germany, 20-23 June 2004. pp. 282-286.

Felippe PA, Silva LH, Santos MB, Sakata ST and CW Arns (2011). Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology* 40(5):445-452.

Gharaibeh S and M Shamoun (2012). Avian metapneumovirus subtype B experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows, and pigeons. *Veterinary Pathology* 49(4):704-709.

Gough RE, Collins MS, Cox WJ and NJ Chettle (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Veterinary Records* 123(2): 58-59.

Heffels-Redman U, Neuman U, Braune S, Cook JKA and J Pruter (1998). Serological evidence for susceptibility of seagulls to avian pneumovirus (APV) infection. Proceedings of the international symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infection in poultry. Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June 1998. pp. 23-25.

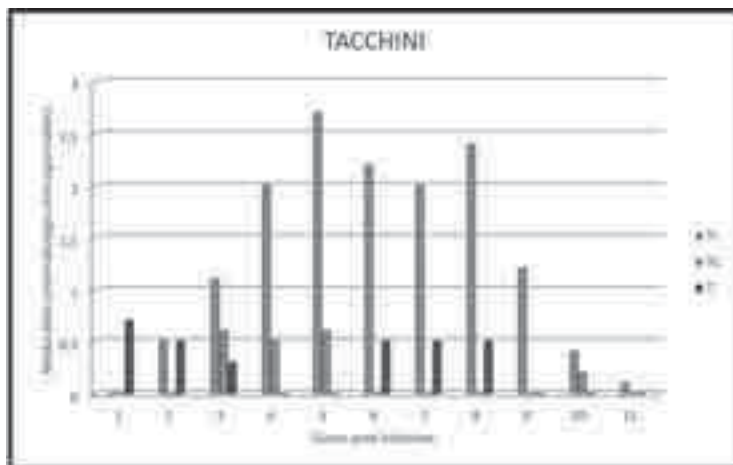
Jones RC (1996). Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. *Avian Pathology* 25(4): 639-648.

Naylor CJ and Jones RC (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine* 12(13):1225-1230.



Toquin D, Guionie O, Allee C, Morin Y, Le coq L, Zwingelsteinn F, Jestin V and N Eterradossi (2006). Compared susceptibility of SPF ducklings and SPF turkeys to the infection by Avian Metapneumoviruses belonging to the four subgroups. Proceedings of the V. International symposium on avian corona- and pneumoviruses and complicating pathogens. Rauishholzhausen, Germany, 14-16 May 2006. pp. 70-76.

**Figura 10.** Media giornaliera della sintomatologia clinica osservata nei gruppi Tacchini infetti (TI), Tacchini Contatto (TC) e Tacchini Controllo (T)



**Figura 11.** Media giornaliera della sintomatologia clinica osservata nei gruppi Piccioni infetti (PI), Piccioni Contatto (PC) e Piccioni Controllo (P)

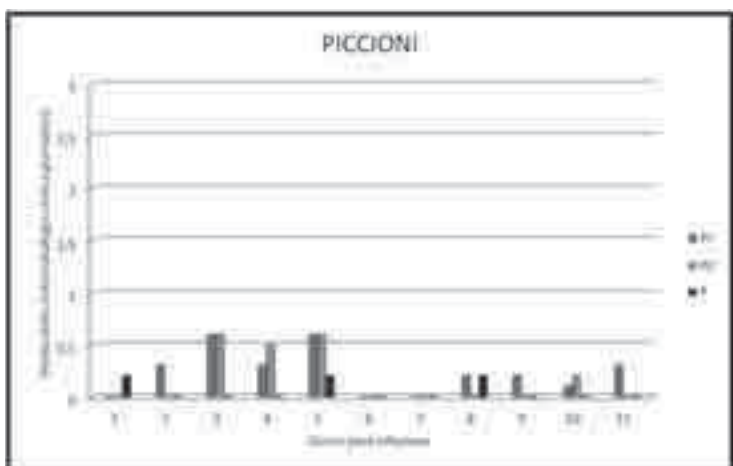


Tabella 1. PROVA SPERIMENTALE 1 – Risultati di RRT-PCR per AMPV nei tamponi respiratori.

Giorni Post-infezione	Isolatore A			Isolatore B			CONTROLLI	
	TI*	PC†	H <sub>2</sub> O	IP‡	TC§	H <sub>2</sub> O	Piccioni	Tacchini
2	10/10*	0/10	n.e.¶	0/10	0/10	n.e.	0/8	0/4
4	9/10	7/10	+	0/10	0/10	-	0/7	0/3
5	9/10	4/10	+	0/10	0/10	-	0/7	0/3
7	6/10	2/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/6	0/2
9	1/10	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
11	1/10	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
14	0/10	1/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
16	0/10	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
<b>TOTAL</b>	<b>36</b>	<b>14</b>	<b>/</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>/</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

\* TI: Tacchini infetti

† PC: Piccioni contatto

‡ PI: Piccioni infetti

§ TC: Tacchini contatto

\* n. positivi/n.campionati

¶Non eseguito

Tabella 2 PROVA SPERIMENTALE 1 – Risultati della RRT-PCR per AMPV nei tessuti.

GRUPPI	3 giorni post-infezione				5 giorni post-infezione				7 giorni post-infezione			
	Trachea	Turbinati Nasali	Coniungtiva	Chiasdola di Harder	Trachea	Turbinati Nasali	Coniungtiva	Chiasdola di Harder	Trachea	Turbinati Nasali	Coniungtiva	Chiasdola di Harder
Tacchini Infetti	1/1*	1/1	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1
Piccioni contatto	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Piccioni Infetti	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Tacchini contatto	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Piccioni controllo	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	n.e. <sup>†</sup>	n.e.	n.e.	n.e.
Tacchini controllo	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

\* 1. Positività, 0. Negatività

† Not detected

# **CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV) ISOLATO IN CORSO DI FORMA RESPIRATORIA NELLA FARAONA**

Cecchinato M.<sup>1</sup>, Morandini E.<sup>2</sup>, Listorti V.<sup>3</sup>, Lupini C.<sup>3</sup>, Pesente P.<sup>2</sup>, Giovanardi D.<sup>2</sup>, Rossi G.<sup>2</sup>, Sperati Ruffoni L.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>*Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi, 5 - 37132 - San Michele Extra, Verona – ITALIA*

<sup>3</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna Via Tolara di Sopra, 5 - 40064 Ozzano Emilia (BO) – ITALIA*

## **Summary**

An outbreak of Avian metapneumovirus (AMPV) infection in Guinea fowl is reported in Northern Italy. A subtype B AMPV strain, named aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12, was isolated and sequenced in F and G genes. Phylogenetic analysis showed that the isolate clustered together with other AMPVs of subtype B isolated in Italy from 2001. The factors involved in determining the outbreak are discussed.

## **INTRODUZIONE**

*Metapneumovirus* aviare (AMPV), virus a RNA a singolo filamento e polarità negativa, appartenente alla famiglia delle *Paramyxoviridae*, colpisce principalmente il tacchino causando un'infezione delle prime vie respiratorie, nota come Rinotracheite del tacchino (TRT).

Pollo (Catelli *et al.*, 1998), fagiano (Catelli *et al.*, 2001), faraona (Picault *et al.*, 1987) ed anatra muta (Toquin *et al.*, 1999) sono ugualmente sensibili all'infezione, anche se in grado minore e diversamente a seconda della specie. In particolare nella faraona sono stati riportati focolai di Sindrome della Testa Gonfia (SHS), analogamente a quanto osservato nel pollo, da cui è stato isolato il virus (Kles *et al.*, 1987). In condizioni sperimentali non è stato possibile riprodurre forme cliniche analoghe a quelle osservate in campo, ma è stata osservata risposta anticorpale specifica (Gough *et al.*, 1988).

Nel presente lavoro viene descritto un focolaio d'infezione da AMPV verificatosi all'inizio del 2012 in un allevamento di faraone da carne della provincia di Verona. Viene riportata la caratterizzazione molecolare del ceppo virale isolato e discussi i possibili fattori condizionanti il manifestarsi di forme cliniche.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamento e focolaio*

Il focolaio oggetto dello studio si è verificato nel febbraio 2012 in un allevamento di faraone da carne, sito a Roverchiara (VR) ed appartenente ad una grossa azienda avicola italiana. Le faraone erano vaccinate nei riguardi della Malattia di Newcastle ad 1 giorno di vita. L'allevamento era costituito da due capannoni (A e B), in ciascuno dei quali erano accasati circa 10.000 soggetti. All'arrivo in allevamento il

veterinario notava che la ventilazione dei capannoni era stata ridotta per far fronte alle rigidità climatiche del momento. Nel gruppo alloggiato nel capannone A, a circa 10 settimane di vita, si è manifestata una sintomatologia caratterizzata da scolo nasale, congiuntivite, lacrimazione e tendenza a tenere gli occhi chiusi. In alcuni soggetti era presente rigonfiamento ed edema sottocutaneo dell'area periorbitale (Fig. 1). Il consumo alimentare risultava ridotto. Tale sintomatologia ha mostrato una regressione dopo trattamento antibiotico e la mortalità è stata dello 0,01%.

#### *Campionamento.*

Da entrambi i gruppi, sia da quello in cui era evidente sintomatologia clinica (A) che dall'altro (B), sono stati prelevati tamponi rinofaringei per isolamento virale e Realtime RT-PCR (qRT-PCR) per AMPV. Considerando che l'infezione da AMPV ha morbilità che facilmente raggiunge il 100% (Stuart, 1989) e quindi prevalenze attese sicuramente superiori al 30%, e che la popolazione di ciascun gruppo era di 10.000 soggetti, 10 campioni/gruppo erano sufficienti per evidenziare l'infezione con un livello di confidenza del 95% (Cannon e Roe, 1982).

Sono stati quindi selezionati 20 soggetti (10 con sintomi clinici e 10 asintomatici) dal gruppo A e 10 soggetti dal gruppo B. I tamponi sono stati processati in 3 pool di 10: Pool 1 (sintomatici gruppo A); Pool 2 (asintomatici gruppo A) e Pool 3 (asintomatici gruppo B).

Da ciascun animale sono stati raccolti contemporaneamente due tamponi destinati, rispettivamente, alla qRT-PCR ed all'isolamento virale. I tamponi destinati alla qRT-PCR sono stati fatti asciugare all'aria per 30 minuti dopo il prelievo, quindi conservati a temperatura ambiente sino alla processazione. Quelli destinati all'isolamento virale sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di ghiaccio fondente sino al momento della preparazione dell'inoculo, che è stata eseguita all'arrivo in laboratorio.

#### *qRT-PCR*

Per evidenziare e tipizzare AMPV dai tamponi a secco, o confermare l'isolamento virale, è stata impiegata una qRT-PCR in grado di differenziare i sottotipi A e B (Cecchinato *et al.*, 2012). L'estrazione dell'RNA dai tamponi a secco e la retrotrascrizione sono state eseguite secondo il metodo descritto da Cavanagh *et al.* (1999). Per confermare l'isolamento virale, l'RNA è stato estratto dal terreno di coltura utilizzando un kit del commercio (QIAamp viral Mini Kit , Qiagen).

#### *Isolamento virale.*

Per l'isolamento virale di AMPV sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo, preparate a partire da embrioni di pollo SPF al 18-20° giorno di incubazione (Catelli *et al.*, 1998). Le colture sono state ritenute positive quando veniva osservata ciliostasi entro 10 giorni dalla inoculazione. La conferma dell'isolamento di AMPV è stata eseguita mediante qRT-PCR.

#### *Sequenziamento ed analisi filogenetiche dei geni F e G.*

Per ottenere le sequenze intere dei geni G ed F sono state eseguite, in maniera indipendente per ciascun gene, una RT e tre PCR overlapping come riportato da Cecchinato *et al.* (2010).

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. I campioni purificati sono stati inviati al Centro BMR Genomics di Padova dove sono stati sequenziati in entrambe le direzioni con il sequenziatore automatico 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate, utilizzando Clustal W, a tutte le sequenze complete dei geni G ed F di AMPV sottotipo B già pubblicate in Genbank. L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo neighbour-joining col software MEGA4. I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

## **RISULTATI**

### *qRT-PCR ed isolamento*

Mediante qRT-PCR, è stato evidenziato AMPV sottotipo B da tutti i pool esaminati. L'isolamento virale ha invece avuto successo solo dal pool di tamponi n.1; tale isolato è stato denominato aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12.

### *Analisi filogenetica dei geni F e G.*

L'isolato AMPV sottotipo B aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12 è stato amplificato e sequenziato nei geni F e G. Le sequenze ottenute sono state analizzate e gli alberi filogenetici ottenuti sono riportati nelle figure 2 (gene F) e 3 (gene G). Il ceppo aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12 forma un cluster unico con i ceppi AMPV sottotipo B isolati, sia da tacchino che da pollo, in Italia a partire dal 2001.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il presente lavoro riporta la prima segnalazione in Italia d'infezione da AMPV nella faraona. La sensibilità di questa specie era già stata riportata in Francia nel 1987 da Picault *et al.* e Kless *et al.*

Il ceppo virale isolato nel corso del focolaio appartiene al sottotipo B ed è strettamente correlato, dal punto di vista filogenetico, ai ceppi che hanno circolato in Italia, nel tacchino e nel pollo, a partire dal 2001 (Cecchinato *et al.*, 2010). Ciò indica la mancanza di peculiarità genetiche nel ceppo AMPV isolato dalla faraona.

Nel nostro Paese la maggior parte degli allevamenti di faraone è situata nel nord, in zone geografiche ad intensa vocazione avicola quali Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna, dove l'infezione da AMPV, in particolare da sottotipo B, è da considerarsi endemica (Catelli, 2006). Tale zona è caratterizzata da una presenza di allevamenti avicoli di più specie e categorie produttive, situati a distanze anche molto ravvicinate. Si ritiene che tale situazione epidemiologica di vicinanza con specie più sensibili ad AMPV della faraona (Gough *et al.*, 1988), e cicli produttivi non sovrapponibili, abbia condizionato l'insorgenza dell'infezione, mentre allo sviluppo della forma clinica abbia contribuito la riduzione del ricambio d'aria operata dall'allevatore per far fronte alle rigidità climatiche che hanno caratterizzato la stagione invernale 2012.

## **BIBLIOGRAFIA**

Canon RM and RT Roe. (1982). Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. *Australian Bureau of Animal Health*. Canberra, Australian Government Publishing Service, 17.

Catelli E. (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da pneumovirus aviare in Italia. Atti del Convegno: Malattie Virali Respiratorie e problemi di produzione, giornata studio INTERVET, Bologna, 7 giugno, 2006, 19-23.

Catelli E, Cook JKA, Chester J, Orbell SJ, Woods MA, Baxendale W and MB Huggins. (1998). The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian Pneumovirus in chickens. *Avian Pathology* 27: 632-640.

Catelli E, De Marco MA, Delogu M, Terregino C and V Guberti. (2001). Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Veterinary Record* 149: 56-58.

Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and CJ Naylor. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions. *Avian Pathology* 28: 593-605.

Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology* 146: 24-34.

Cecchinato M, Lupini C, Munoz Pogoreltseva OS, Listorti V, Mondin A and E Catelli. (2012). Development of a one-step real time RT-PCR assay for the detection, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtype A and B. VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. Rauischholzhausen, Germany, 18-21 June 2012.

Gough R, Collins MS, Cox WJ and NJ Chettle. (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Veterinary Record* 123: 58-59.

Kles V, Morin M, Picault JP, Drouin P, Guittet M and G Bennejean. (1987) Isolement d'un virus dans un cas de syndrome infectieux du gonflement de la tete avec coryza chez la pintade. *L'aviculteur* 483:112.

Picault JP, Giraud P, Drouin M, Guittet M, Bennejean G, Lamande J, Toquin D and C Gueguen. (1987). Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome. *Veterinary Record* 121: 135.

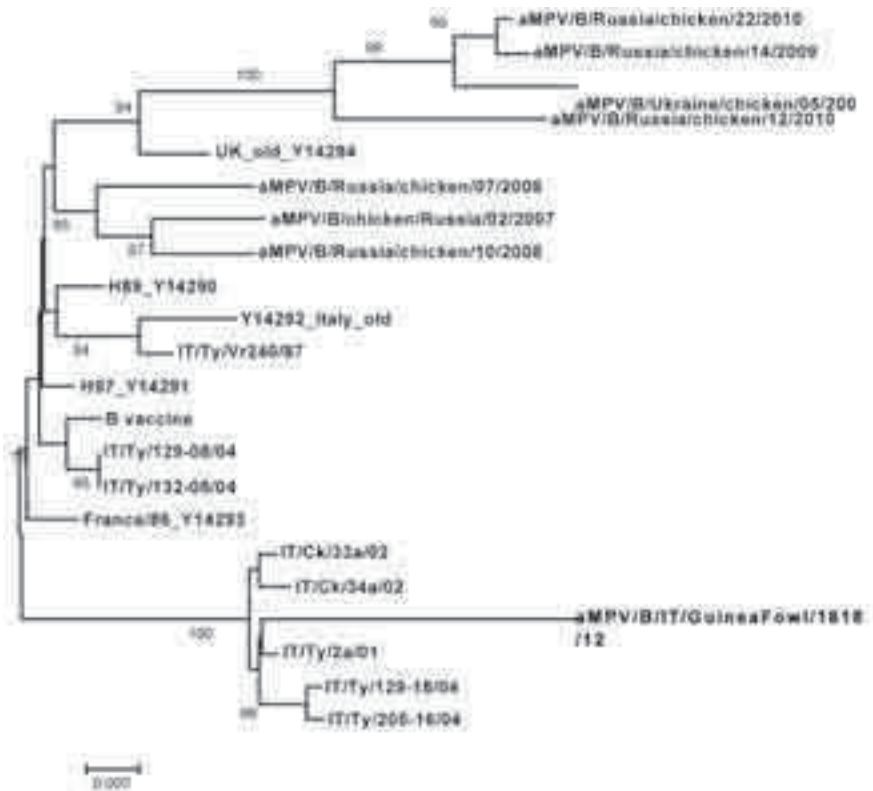
Stuart JC. (1989) Rinotracheitis: turkey rinotracheitis in Great Britain. In recent advances in turkey science. *Poultry Science Symposium* Series No. 21, Eds. C. Nixey 6 T.C. Grey, Butterworth, London, 217-224.

Toquin D., Bayon-Aboyer M.H., Eterradossi N., Morin H. and FL Jestin. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Veterinary Record*, 145: 680.

**Figura 1.** Faraona con infezione da Metapneumovirus Aviare: rigonfiamento dell'area periorbitale.

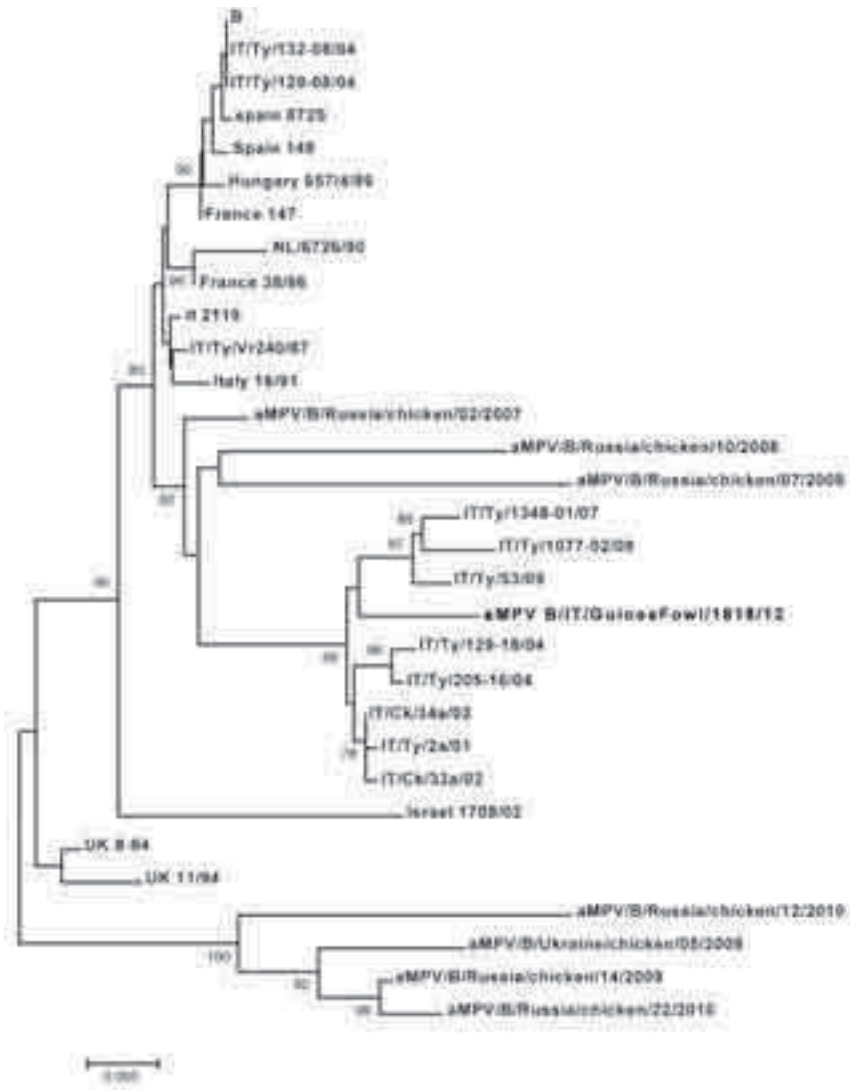


**Figura 2.** Albero filogenetico di ceppi di AMPV sottotipo B. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene F, utilizzando MEGA4. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.





**Figura 3.** Albero filogenetico di ceppi di AMPV sottotipo B. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene G, utilizzando MEGA4. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.



## **MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI E LA QUANTIFICAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A E B**

Cecchinato M.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Munoz Pogoreltseva O.S.<sup>2</sup>, Listorti V.<sup>2</sup>, Mondin A.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 40064 Ozzano Emilia (BO) – Italia*

### **Summary**

Direct diagnosis of avian Metapneumovirus (AMPV) infections rely on molecular techniques more than on virus isolation due to the fastidious nature of the virus. Six real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) protocols for the detection and differentiation of AMPV subtype A and B were developed in N (two tests), F, SH (two tests) and G genes. In five assays SYBR Green I was used as detection system, and in one, molecular beacon probes. Specificity was evaluated using various AMPV strains and other avian respiratory viruses such as Newcastle disease virus, Infectious laryngotracheitis virus and Infectious bronchitis viruses. All tests were able to detect AMPVs and failed to detect non-AMPV viruses, and five out of six of them were also able to discriminate between AMPV A and B subtypes. Sensitivity was determined using serial dilutions of RNA extracted from AMPV of both subtypes. The best results in terms of specificity and sensitivity were given by the qRT-PCR protocol developed using a set of primers designed in the SH gene.

### **INTRODUZIONE**

Il Metapneumovirus aviare (AMPV) è un virus RNA a singolo filamento non segmentato a polarità negativa. Finora sono stati identificati quattro sottotipi di questo virus, A, B, C e D (Gough e Jones, 2008). I primi due sono quelli maggiormente diffusi a livello mondiale e sono gli unici ad essere stati segnalati nel territorio italiano. Il sottotipo B è quello maggiormente diffuso in Italia (Cecchinato *et al.*, 2010), soprattutto nelle zone del Nord, dove vi è una maggiore concentrazione di allevamenti avicoli.

Il virus colpisce diverse specie aviari, particolarmente tacchino e pollo. Nel tacchino causa un'infezione acuta e molto contagiosa del tratto respiratorio superiore, la Rinotracheite del tacchino (TRT). Mentre nel pollo causa una malattia clinica meno evidente e meno grave, sempre che non sia complicata da altri fattori, soprattutto batterici come *Escherichia coli* (Gough e Jones, 2008). In questi casi sfocia spesso nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Può causare perdite economiche significative, legate principalmente alle infezioni batteriche secondarie (OIE, 2012a). Sia nel tacchino che nel pollo è in grado anche di provocare cali della ovodeposizione (Naylor e Jones, 1993; Cecchinato *et al.*, 2012).

La variabilità genomica di AMPV insieme con le manifestazioni cliniche non patognomoniche riportate nelle diverse specie aviari, la sua scarsa capacità di replicazione nell'organismo ospite e la sua capacità di causare infezioni in assenza

di sintomatologia clinica evidente (Cook *et al.*, 1988), rendono necessari metodi diagnostici molto sensibili, accurati e affidabili (Cook e Cavanagh, 2002). La biologia molecolare offre un'alternativa veloce, sensibile, pratica e specifica per la diagnosi delle infezioni sostenute da AMPV (OIE, 2009) rispetto alle metodiche classiche. Per questa ragione nel corso degli anni sono stati messi a punto diversi protocolli di RT-PCR per la ricerca di questo virus e negli ultimi anni è stata rivolta particolare attenzione all'applicazione di una variante della PCR convenzionale, la Real-Time PCR. La Real-Time PCR è una tecnica che permette di osservare la cinetica della formazione degli amplificati in tempo reale grazie all'uso di sostanze fluorescenti che si legano, in forma specifica o aspecifica, alla sequenza bersaglio e successivamente emettono un segnale fluorescente che aumenta di intensità con l'aumentare del numero di amplificati sintetizzati. Permette simultaneamente di identificare e quantificare la sequenza bersaglio e non richiede ulteriori passaggi per la visualizzazione dell'amplificato come invece avviene nella PCR, riducendo così i tempi di diagnosi e limitando la manipolazione del campione (Watzinger *et al.*, 2006).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una Real-Time PCR capace di identificare, discriminare e quantificare AMPV sottotipo A e B.

Nella prima fase è stato utilizzato un sistema di quantificazione aspecifico. Sono state testate varie coppie di primer, disegnate sulle sequenze di geni diversi, e scelta la migliore in termini di sensibilità e specificità. Nelle fasi successive il sistema di quantificazione è stato sostituito con sonde sottotipo specifiche. Il protocollo è stato successivamente ottimizzato e messo a confronto con il protocollo di RT nested-PCR per AMPV, attualmente più usato sia in Italia che all'estero, disegnato da Naylor *et al.* (1997), testando ceppi virali a titolo noto e campioni da prove sperimentali.

## MATERIALI E METODI

### *SYBR® Green I qRT-PCR*

In base a criteri di carattere economico e pratico si è scelto in via preliminare di mettere a punto la qRT-PCR con l'uso di SYBR® Green I. Le sequenze dei geni che codificano per la nucleoproteina (N), la glicoproteina di superficie (G), la proteina di fusione (F) e la *small hydrophobic protein* (SH) di AMPV sottotipo A e B, presenti in GenBank o derivanti da precedenti studi di sequenziamento (Catelli *et al.*, 2006; Cecchinato *et al.*, 2010), sono state usate per disegnare una coppia di primer per ciascuno di questi geni. Tutti i primer sono stati progettati con l'uso del software Beacon Designer 7.0. Inoltre sono stati usati anche i primer disegnati da Bâyon-Auboyer *et al.* (1999) diretti verso il gene N.

Tutte le coppie di primer sono state testate per la loro capacità di identificare e differenziare AMPV A e B mediante analisi delle curve di dissociazione ottenute dagli amplificati di ceppi noti di AMPV.

Infine utilizzando i Cp ottenuti da diluizioni seriali di RNA estratto da un ceppo di AMPV sottotipo B (IT/Ty/B/Vr240/87) è stato possibile creare una curva standard da cui è stata calcolata l'efficienza e l'errore della reazione per ogni coppia di primer.

## *Molecular Beacon one-Step qRT-PCR*

In base ai risultati ottenuti con le prove eseguite usando SYBR® Green I come chimica fluorescente, si è deciso di continuare le prove con la coppia di primer diretti verso la sequenza del gene SH e si è optato di cambiare chimica fluorescente e di disegnare e utilizzare due sonde Molecular Beacon sottotipo specifiche. Ciascuna sonda è stata marcata con un fluorocromo diverso, così da potere differenziare i due sottotipi grazie alle diverse lunghezze d'onda emesse dai fluorocromi.

Questo nuovo protocollo è stato testato in termini di:

- specificità: sottoponendo a qRT-PCR 15 ceppi di AMPV e altri microrganismi responsabili di infezione respiratoria nel pollame;
- limite inferiore di sensibilità (OIE, 2012b): è stato calcolato utilizzando diluizioni seriali in base 10 di sospensioni virali a titolo noto di AMPV-A (ceppo IT/Ty/A/259-01/06) e AMPV-B (ceppo IT/Ty/B/Vr240/87). Ciascun ceppo virale è stato suddiviso in due aliquote. Ciascuna aliquota è stata sottoposta da parte di due operatori a diluizioni scalari in base 10, in triplicato. L'RNA è stato estratto da ciascun replicato e usato come template per due qRT-PCR eseguite da due operatori diversi così da ottenere 12 replicati per ciascuna diluizione.
- linearità, errore ed efficienza: i Cp ottenuti dai 12 replicati descritti nel paragrafo precedente, sono stati utilizzati per creare una curva standard per ciascun virus da cui poi sono stati calcolati tali parametri.

Infine è stato eseguito un paragone tra la qRT-PCR messa a punto in tale studio e la RT nested-PCR descritta da Naylor *et al.* (1997), uno dei protocolli diagnostici maggiormente utilizzati per l'identificazione e la tipizzazione di AMPV sottotipo A e B. Per tale confronto sono stati utilizzate diluizioni scalari in base 10 di RNA estratto da AMPV-A (ceppo IT/Ty/A/259-01/06) e AMPV-B (ceppo IT/Ty/B/Vr240/87) e campioni ottenuti da soggetti inoculati sperimentalmente con AMPV-A (ceppo LTZ) e AMPV-B (ceppo IT/Ty/B/Vr240/87).

## **RISULTATI**

### *SYBR® Green I RRT-PCR*

Tutte le coppie di primer disegnate nel presente lavoro sono state in grado di amplificare i ceppi di AMPV analizzati con valori di Cp che oscillavano da 17,65 a 35. I Cp più bassi sono stati registrati con i primer disegnati in questo studio sul gene N (Cp 23,37) quando è stato utilizzato come *template* AMPV-A. La qRT-PCR che prevedeva l'utilizzo dei primer in SH è risultata la più sensibile per AMPV-B (Cp 17,65). La coppia di primer disegnata in F ha prodotto Cp più elevati utilizzando come *template* entrambi i ceppi di AMPV (AMPV-A Cp 35; AMPV-B 25,45).

Per valutare la capacità dei primer di discriminare fra i sottotipi A e B, sono state considerate le differenze fra le temperature di *melting* (Tm) dei diversi ceppi. È stata considerata discriminante una differenza di circa 1°C. Scartata la coppia di primer in G per la sua incapacità di produrre delle Tm univoche, fra gli altri primer, tutti, tranne la coppia di primer disegnati in N, hanno prodotto delle Tm ben distinte fra i sottotipi considerati. La coppia di primer in F è stata quella che ha prodotto delle Tm più diverse fra i sottotipi (differenza di 1,88 °C), mentre quella in N ha originato Tm

non soltanto molto simili fra i sottotipi (AMPV A 78,29; AMPV B 78,12), ma anche molto vicine alla Tm del controllo negativo (78,25).

I primer disegnati in SH hanno prodotto la reazione con indice di errore più basso (0,00217) ed i primer in N la migliore efficienza (2,006), giacché più vicina a 2. Nonostante questo, la maggiore linearità della reazione è stata ottenuta con i primer in SH probabilmente grazie al loro indice di errore più basso. Inoltre questi primer sono risultati quelli più sensibili, dando i valori di Cp più bassi.

Analizzando però le Tm prodotte con tali primer, è stato possibile osservare come queste erano specifiche ed univoche fino a diluizioni  $10^{-3}$  dell'RNA virale mentre a diluizioni maggiori comparivano due picchi, di cui uno molto vicino alla Tm del controllo negativo.

La mancanza di specificità a basse concentrazioni ha reso questo protocollo poco adatto per la quantificazione virale, motivo per il quale si è deciso di continuare la messa a punto del protocollo con l'utilizzo dei primer disegnati in SH e di sostituire la chimica fluorescente SYBR® Green I con l'utilizzo di sonde, sistema di quantificazione più specifico.

#### Molecular Beacon one-Step qRT-PCR

- Specificità: tutti i ceppi AMPV sia A che B testati sono stati amplificati dando dei Cp che oscillavano fra 14,39 e 24,13. Non sono invece stati amplificati gli altri virus testati.

- Limite inferiore di sensibilità: il limite inferiore di sensibilità rilevato è stato di  $10^{-0,41} ID_{50}/ml$  per AMPV-B IT/Ty/B/Vr240/87 e  $10^{1,15} ID_{50}/ml$  quanto testato il ceppo AMPV-A IT/Ty/A/259-01/03.

- linearità, errore ed efficienza: i risultati sono riportati in Tab. 1.

**Tab. 1** Efficienza, errore e linearità della qRT-PCR messa a punto in questo studio.

		Efficienza	Errore	R <sup>2</sup>
Virus	IT/Ty/A/259-01/03	2,043	0,193	0,9375
	IT/Ty/B/Vr240/87	1,842	0,132	0,957

La qRT-PCR con l'utilizzo di sonde, messa a confronto con la RT nested-PCR descritta da Naylor *et al.* (1997), è risultata 1.000 volte più sensibile nel rilevare l'RNA estratto da AMPV-B e 10.000 nel rilevare l'A.

Il confronto dei risultati ottenuti utilizzando campioni di AMPV sottotipo A e B ottenuti da due diverse prove di inoculazione sperimentale, ha confermato i risultati dalle prove di sensibilità utilizzando diluizioni seriali di RNA, cioè la maggiore sensibilità del protocollo di qRT-PCR rispetto alla RT nested-PCR. Sul totale dei 50 campioni esaminati durante la prova sperimentale di inoculazione del ceppo AMPV-A, la RT nested-PCR ha identificato come positivo soltanto un campione. Al contrario, la qRT-PCR ne ha identificati come positivi 45 su 50. La sensibilità

della RT nested-PCR non è migliorata quando si sono testati i campioni sperimentali di AMPV sottotipo B. Su un totale di 32 campioni la RT nested-PCR è riuscita ad identificare l'RNA virale in 5 campioni mentre la qRT-PCR ne ha identificati 31 su 32.

## DISCUSSIONE

Nel presente studio è stato messo a punto un protocollo di qRT-PCR in grado di identificare, discriminare e quantificare AMPV sottotipo A e B.

Inizialmente è stato scelto come metodo di quantificazione una chimica fluorescente, pratica e relativamente economica, SYBR® Green I, ed è stata valutata quale coppia di primer fosse più sensibile e specifica. Sono state disegnate e testate quattro coppie di primer rispettivamente sulla sequenza dei geni F, SH, G ed N assieme ad una coppia di primer disegnata in N da Bâyon-Auboyer *et al.* (1999).

Alla fine dei primi test si è giunti alla conclusione che i primer più sensibili, specifici e capaci di dare la curva standard più lineare erano quelli basati sulla sequenze del gene SH, nonostante ci si potesse aspettare che i primer più sensibili sarebbero stati quelli basati sulla sequenza del gene N. Infatti esistono studi che indicano che, nei virus ad RNA a singolo filamento non segmentato a polarità negativa, i geni più vicini all'estremità 3' sono trascritti più abbondantemente rispetto agli altri (Barik, 1992). Questa caratteristica è tipica dei virus appartenenti all'ordine dei *Mononegavirales* e il gene N è proprio il gene più vicino all'estremità 3' negli AMPV. Infatti la qRT-PCR per la diagnosi di AMPV, basata sul gene G, testata da Guionie *et al.* (2007), ha mostrato una minore sensibilità rispetto ad una qRT-PCR disegnata sul gene N per la diagnosi del Metapneumovirus umano (Maertzdorf *et al.*, 2004).

Il protocollo in SH è stato in grado di discriminare fra sottotipo A e B, perché ha dato origine a Tm specifiche per ogni sottotipo. Tuttavia a basse concentrazioni di RNA virale, le Tm non erano univoche e ciò ha reso il protocollo non affidabile per prove di quantificazione.

Bisogna comunque sottolineare che, anche se il protocollo di qRT-PCR con SYBR®Green I non ha permesso la quantificazione affidabile dell'RNA virale, esso potrebbe comunque essere usato come metodo diagnostico grazie alla sua specificità, economicità ed indipendenza da eventuali mutazioni genomiche presenti nell'amplificato.

Poiché l'obiettivo dello studio era anche mettere a punto un protocollo in grado di quantificare l'RNA virale, si è deciso di sostituire il sistema di quantificazione. Di conseguenza sono state disegnate sonde Molecular Beacon sottotipo A e B specifiche. Queste sonde, se ben disegnate, sono capaci di distinguere anche un singolo *mismatch* in forma più accurata di qualsiasi altra sonda (Tyagi *et al.*, 1998); il che le rende molto specifiche però anche molto dipendenti dalla costanza nel tempo della sequenza che hanno come bersaglio.

Nonostante ciò il test disegnato in SH si è dimostrato capace di identificare e discriminare diversi ceppi di AMPV-B isolati in un arco di tempo che va dal 1987 al 2010. Ciò indica che le variazioni genetiche avvenute in queste ultime due decenni non sono state tali da inficiare la capacità dei primer e della sonda scelti di identificare i ceppi di sottotipo B italiani. La tendenza alla mutazione del gene SH rende necessario avere a disposizione informazioni relative alla evoluzione dei ceppi di campo nel tempo per non incorrere in campioni diagnostici falsi negativi.

Questo nuovo protocollo di qRT-PCR basato sul gene SH è stato confrontato con la

RT nested-PCR disegnata sul gene G da Naylor *et al.* (1997). Questo ha permesso di dimostrare una sensibilità molto maggiore della qRT-PCR nel mettere in evidenza sia diluizioni di RNA di ceppi virali a titolo noto sia campioni ottenuti da prove sperimentali. Tali dati sono in contrasto con i risultati ottenuti da Ferreira *et al.* (2009), che hanno riscontrato medesima sensibilità fra qRT-PCR e RT nested-PCR confrontati.

Le curve standard generate utilizzando come campioni diluizioni seriali di ceppi di AMPV-A e -B a titolo noto hanno mostrato una buona linearità ( $R^2 > 0,9375$ ) tra i valori di Cp ottenuti e la quantità di virus sottoposta a qRT-PCR. Tale riscontro rende il presente protocollo diagnostico affidabile per una corretta quantificazione virale e di conseguenza utilizzabile in studi sperimentali che richiedono una determinazione del titolo virale.

## CONCLUSIONI

Il protocollo di qRT-PCR per AMPV messo a punto nel presente lavoro, che utilizza primer disegnati sulla sequenza del gene SH e sonde Molecular Beacon come metodo sia di discriminazione che quantificazione, rappresenta un valido strumento diagnostico ed una possibile alternativa alla RT nested-PCR attualmente in uso in molti laboratori diagnostici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barik S. (1992). Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s). *Journal of virology* 66: 6813-8.
2. Bayon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M and N Eterradossi. (1999). Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Archives of virology* 144: 1091-1109.
3. Catelli E, Cecchinato M, Savage CE, Jones RC and CJ Naylor. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine* 24: 6476-6482.
4. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology* 146: 24-34.
5. Cecchinato M, Lupini C, Ricchizzi E, Falchieri M, Meini A, Jones RC and E Catelli. (2012). Italian field survey reveals a high diffusion of avian metapneumovirus subtype B in layers and weaknesses in the vaccination strategy applied. *Avian Diseases* 56: doi: 10.1637/10202-041312-Reg.1, in fase di stampa.
6. Cook JKA, Dolby CA, Southee DJ and APA Mockett. (1988). Demonstration of antibodies to turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared flocks of chickens. *Avian Pathology*, 17: 403-410.
7. Cook JKA and D Cavanagh (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology* 31: 117-132.
8. Ferreira HL, Spilki FR, Santos MMA, de Almeida RS and CW Arns. (2009). Comparative evaluation of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR (RRT-PCR) for detection of avian metapneumovirus subtype A. *Ciência Rural, Santa Maria* 39: 1445-1451.

9. Gough RE and RC Jones. (2008). Avian Metapneumoviruses. In Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Eds). *Diseases of Poultry* 12<sup>th</sup> edn, Ames: Blackwell Publishing, pp. 100-110.
10. Guionie O, Toquin D, Sellal E, Bouley S, Zwingelstein F, Allee C, Bougeard S, Lemiere S and N Etteradossi. (2007). Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. *Journal of virological methods* 139: 150-8.
11. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, van den Hoogen BG, Spaete R, Osterhaus AD and RA Fouchier. (2004). Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 981-986.
12. Naylor CJ and RC Jones. (1993). Turkey rinotracheitis virus: a review. *Veterinary Bulletin* 63: 439-449.
13. Naylor C, Shaw K, Britton P and D Cavanagh. (1997). Appearance of type B avian Pneumovirus in great Britain. *Avian Pathology* 26: 327-38.
14. OIE – World Organization of Animal Health (2012a). Turkey rhinotracheitis (avian metapneumovirus infections). In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 3.3.15, available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.15\\_TURKEY\\_RHINO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.15_TURKEY_RHINO.pdf). Accessed September 2012.
15. OIE – World Organization of Animal Health (2012b). Principles and methods of validation of diagnostic assay for infectious diseases. In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 1.1.5, available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards-/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards-/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf). Accessed September 2012.
16. Tyagi S, Bratu DP and FR Kramer. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* 16: 49-53.
17. Watzinger F, Ebner K and T Lion. (2006). Review: detection and monitoring of virus infections by real time PCR. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 254-298.



# VALUTAZIONI PRELIMINARI DI UNA MISCELA DI *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SULLE PERFORMANCE DELLA GALLINA OVAIOLE E SULLA QUALITÀ DELL'UOVO

Cesari V.<sup>1</sup>, Toschi I.<sup>1</sup>, Giardini A.<sup>3</sup>, Ferrazzi V.<sup>2</sup>, Gallazzi D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano; <sup>3</sup>Centro Sperimentale del Latte S.p.A.

## Summary

Lactobacilli are commonly used as probiotics in poultry production for their beneficial effect on the host through maintenance of the gut microbiota balance. The aim of this study was to evaluate the effect of a mixture of *L. acidophilus* and *L. plantarum* administered with drinking water on egg quality and layer performance. The trial, performed on two different farms, was conducted on 480 laying hens which were housed in pens. The animals, from 21 to 44 weeks of age, were divided into two groups: the hens of the Treatment group (T) received water with the supplementation of 10<sup>8</sup> CFU/animal/day of the experimental mixture, while animals of the other group received water without any supplementation (Control = C). Number and weight of eggs were recorded daily, while feed consumption and body weights of the animals were registered every week and monthly, respectively. At 25, 30, 35, 40 and 44 weeks of age, specific gravity of eggs, albumen quality (Haugh Units) and shell thickness were measured on 30 eggs/group.

During the experimental period, body weight, daily feed intake and feed conversion rate of the animals were not significantly affected by the supplementation of the microbial feed additive. Moreover, no significant difference was observed in egg production and egg mass of hens between the two groups. Egg quality, instead, was influenced by the experimental treatment; in particular, specific gravity and Haugh Units of eggs in the T group were significantly higher in comparison to the C group. In conclusion, the supplementation of this mixture in drinking water did not influence growth performance of hens, but seemed to improve some characteristics of egg quality.

## INTRODUZIONE

I probiotici sono microrganismi vivi che hanno effetti positivi sulla popolazione batterica del tratto gastrointestinale dell'ospite attraverso l'inibizione della crescita di batteri patogeni e la stimolazione della crescita della microflora intestinale commensale. In particolare, i lattobacilli sono i probiotici maggiormente utilizzati nel settore avicolo. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto di una miscela di *L. acidophilus* e *L. plantarum*, somministrata nell'acqua di bevanda, sulla qualità dell'uovo e sulle performance produttive di ovaiole allevate a terra.

## MATERIALI E METODI

La prova, effettuata in due differenti allevamenti, è stata realizzata su 480 ovaiole Hy-Line Brown, allevate a terra in 12 box. In ogni allevamento, dalla 21<sup>a</sup> alla 44<sup>a</sup> settimana di età, 240 galline ovaiole sono state suddivise in due gruppi sperimentali

(Trattato e Controllo, 3 repliche/gruppo). Le galline del gruppo T ricevevano acqua con l'aggiunta di  $10^8$  UFC/animale/giorno della miscela sperimentale, mentre gli animali del gruppo C ricevevano acqua senza alcuna aggiunta.

Durante il periodo sperimentale, il numero e il peso delle uova erano determinati giornalmente, mentre il consumo di alimento e il peso degli animali erano registrati rispettivamente ogni settimana e ogni mese. A 25, 30, 35, 40 e 44 settimane di età su 30 uova per gruppo sono state misurate la densità, l'Indice di Haugh e lo spessore del guscio.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Durante l'intero periodo sperimentale, l'aggiunta della miscela di lattobacilli all'acqua di bevanda non ha influenzato significativamente il peso vivo degli animali, l'ingestione di alimento e l'indice di conversione alimentare (Tabella 1). Nessuna differenza, inoltre, è stata registrata in termini di produzione di uova, massa e peso dell'uovo tra i due gruppi sperimentali.

Tabella 1: Effetto di una miscela di *L. acidophilus* e *L. plantarum* sulle performance produttive dalla 21<sup>a</sup> alla 44<sup>a</sup> settimana di età.

		Trattamento			Probabilità
		T	C	ES	T
Peso vivo iniziale	g	1711	1714	13,4	NS
Peso vivo finale	g	2005	2005	19,4	NS
% di deposizione	%	87,3	86,6	0,35	NS
Peso medio uovo	g	63,2	63,5	0,13	NS
Ingestione/capo	g/d	114	113	0,89	NS
ICA	kg alimento/ kg uova	2,12	2,11	0,02	NS
Peso uovo/gallina accasata	g/d	54,3	53,9	0,26	NS

NS: non significativo.

La qualità dell'uovo, invece, in termini di indice di Haugh e di densità delle uova, è risultata influenzata positivamente dall'effetto del trattamento con valori maggiori nel gruppo T (92,8 e 1.091 g/cm<sup>3</sup>, rispettivamente) rispetto al gruppo controllo (91,2 e 1.089 g/cm<sup>3</sup> rispettivamente). Anche lo spessore del guscio, infine, ha presentato valori numericamente maggiori, anche se non statisticamente significativi, nel gruppo T rispetto a quello di controllo.

Tabella 2: Effetto di una miscela di *L. acidophilus* e *L. plantarum* sulla qualità dell'uovo.

		Trattamento			Probabilità
		T	C	ES	T
Densità	g/cm <sup>3</sup>	1.091	1.089	0,001	*
Spessore guscio	mm	0,389	0,388	0,002	NS
Indice di Haugh		92,8	91,2	0,47	*
% di uova rotte	%	1,94	1,84	0,12	NS

NS: non significativo; \*: P<0.05.

### CONCLUSIONI

Nel presente lavoro, l'aggiunta di *L. acidophilus* e di *L. plantarum* nell'acqua di bevanda non ha influenzato in modo significativo le performance produttive delle galline, ma ha migliorato alcune caratteristiche qualitative delle uova.

### BIBLIOGRAFIA

1. Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. A review. *J. Appl. Bact.* 66: 365-3788.
2. Gallazzi D., Giardini A., Mangiagalli M.G., Marelli S., Ferrazzi V., Orsi C., Cavalchini L.G. (2008). Effects of *Lactobacillus acidophilus* D2/CSL on laying hen performance. *Ital. J. Anim. Sci.* 7: 27-37.
3. Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N., Jalaludin S. (1998). Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Sci.* 77: 1259-1265.
4. Patterson J.A., Burkholder K.M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Sci.*, 82: 627-631.

## DAL PAPPAGALLO AL DIAMANTE DI GOULD: UN NUOVO OSPITE PER BFDV (BEAK AND FEATHER DISEASE VIRUS)

Circella E., Legretto M., Pugliese N., Bozzo G., Caroli A., Camarda A.

*Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, Valenzano (BA), Italia*

### Summary

Beak and Feather Disease Virus (BFDV) is a member of the genus *Circovirus* and causes the Psittacine Beak and Feather Disease (PBFD) in *Psittaciformes*. PBFD is a severe disease generally characterized by immunodeficiency and beak and feather disorders. Although *Circovirus* spp. have been detected in several non-psittacine specie, little is known about the symptoms and the disease associated to this infection in birds other than *Psittaciformes*. Nevertheless, PBFD has never been described in non-psittacine specie. In this study, we reported an outbreak of *Circovirus* infection in a flock of Gouldian finches where beak and feather disorders were observed. Sequence analyses on the *rep* gene of the virus highlighted a strong similarity at nucleotide and amino acid level with the corresponding regions of BFDV.

### INTRODUZIONE

*Circovirus* appartiene alla famiglia *Circoviridae*, ed è un virus privo di envelope, a DNA circolare a singolo filamento (Niagro et al., 1998). Il suo genoma codifica per due proteine principali, replication associated protein (Rep) e coat protein (CP). È inoltre presente la regione ORF (open reading frame), la cui funzione non è stata ancora ben definita (Varsani et al., 2010).

Al genere *Circovirus* appartiene BFDV (Beak and Feather Disease Virus), che rappresenta l'agente di una delle più importanti e frequenti infezioni degli psittacidi, la Malattia del becco e delle penne (Psittacine Beak and Feather Disease - PBFD), così denominata in quanto caratterizzata da possibili anomalie a carico del piumaggio e del becco (Gerlach, 1994). L'infezione è però particolarmente temuta perché associata ad immunodepressione, dovuta a deplezione dei tessuti linfoidi colpiti, in particolare timo e borsa di Fabrizio, che predispone il soggetto colpito a frequenti infezioni secondarie di natura batterica e/o fungina (Kato et al., 2010; Todd, 2004). Attualmente, l'infezione da *circovirus* è stata identificata in più di 60 differenti specie di psittacidi e si ritiene abbia distribuzione pressochè mondiale (Todd, 2004; Cathedral-Ortiz et al. 2010). *Circovirus* è stato inoltre identificato anche in altre specie come i canarini (Todd et al., 2001; Rampin et al., 2006), i piccioni (Mankertz et al. 2000; Todd. et al. 2001; Duchatel et al., 2006; Todd et al. 2008), gli struzzi (Shivaprasad et al. 1993; Eisenberg et al. 2003), le oche (Todd. et al. 2001; Chen et al. 2003) le anatre (Smyth et al., 2005), il corvo australiano (Stewart et al. 2006) ed il diamante di Gould (Shivaprasad et al., 2004). Tuttavia in queste specie la PBFD non è stata riportata e le manifestazioni cliniche associate all'infezione non sono state ben descritte e definite. In questo lavoro, viene riportato un particolare caso di infezione da *circovirus* in un allevamento di diamanti di Gould in cui si sono manifestati segni clinici generalmente riconducibili a PBFD. Il virus è stato caratterizzato geneticamente.

## MATERIALI E METODI

### *Caso clinico*

Il gruppo di diamanti di Gould era costituito da 5 coppie di riproduttori e 6 giovani, allevati tutti insieme in un'unica voliera esterna durante la stagione favorevole e spostati, durante i mesi più rigidi, in una voliera interna. I riproduttori erano pienamente adattati alla vita in colonia, portavano a termine le cove ed allevavano i piccoli in autonomia. Non erano pertanto presenti altre specie di volatili quali i passeri del Giappone, generalmente adottati come balie per i diamanti di Gould. Tra la tarda primavera e l'estate 2011, i soggetti adulti svilupparono anomalie a carico del becco, rappresentate da allungamento e comparsa di rugosità ed escrescenze, che progredirono nell'arco di pochi mesi coinvolgendo in particolare il becco superiore (foto 1). Inoltre in 2 adulti, entrambi femmine, si osservava perdita di piume che portava ad alopecie localizzate prevalentemente alla regione della testa e del collo. Vennero inoltre riportate dall'allevatore infertilità e ridotta schiudibilità delle uova. Nei soggetti giovani il piumaggio ed il becco non apparivano alterati. Tuttavia, due giovani di circa tre mesi di età morivano nell'arco temporale di tre settimane, dopo aver mostrato leggero abbattimento, diarrea e arruffamento del piumaggio.

I soggetti deceduti sono stati analizzati presso la Sezione di Patologia aviaria del Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia dell'Università di Bari. Inoltre, dai riproduttori sono stati raccolti campioni di penne e feci da sottoporre a test diagnostici.

### *Esami batteriologici e parassitologici*

Gli esami batteriologici sono stati eseguiti, dai volatili deceduti, a partire da campioni di fegato, milza e sangue del cuore su terreni selettivi (MacConkey Agar, Oxoid, Milano) e arricchiti (Agar sangue, Oxoid, Milano), in condizioni di aerobiosi ed anaerobiosi a 37 °C per 24 ore.

Gli esami parassitologici sono stati eseguiti dai campioni di feci dei riproduttori e dal contenuto intestinale dei soggetti giovani deceduti, mediante flottazione in soluzione sovrasatura di cloruro di sodio con aggiunta di glucosio (650 g/L).

### *Esami istologici*

Campioni di fegato sono stati prelevati dai due giovani soggetti deceduti e posti in formalina al 10% per gli esami istologici. Dopo inclusione in paraffina, sono state effettuate sezioni di 4 µm, colorate con ematossilina-eosina.

### *Ricerca virologica*

*Circovirus* e *polyomavirus* (APV) sono stati ricercati mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) nei campioni di fegato, milza, contenuto intestinale e penne prelevati dai giovani diamanti deceduti e nei campioni di penne e feci prelevati dai riproduttori. L'estrazione del DNA è stata ottenuta mediante il kit commerciale EuroGold Tissue Mini Kit (EuroClone, Milan, Italy) secondo le indicazioni del produttore. La miscela di reazione di PCR era così costituita: 1 U di Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen, Milano, Italia), 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di ogni dNTP e 25 pmol di ogni *primer*. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti fino a 400 ng di DNA. Per la ricerca di *circovirus* sono stati utilizzati i primers DCiVf/DCiVr (Todd et al., 2001) con qualche modifica al protocollo termico, viste le differenti temperature

di melting dei primers. Per la ricerca di APV sono stati adottati primers e programma termico proposti da Manarolla et al. (2007). I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio colorato con etidio bromuro (0.5 mg/mL).

### *Clonaggio e sequenziamento*

Due prodotti di PCR positivi per *circovirus*, provenienti rispettivamente dal fegato di un giovane e dalle penne di un riproduttore, sono stati purificati mediante EuroGold Cycle-Pure Kit (EuroClone) e clonati pGEM<sup>®</sup>-T Easy cloning vector (Promega, Milan, Italy), secondo le indicazioni dell'azienda produttrice. Tre-quattro cloni positivi sono stati scelti per ogni campione e il loro inserto sequenziato mediante Big Dye Terminator v3.1. Le sequenze ottenute sono state assemblate mediante SeqManII (DNASTar, Madison, US) ed identificate in GenBank mediante BLAST. Essendo tra loro identiche, solo uno dei due cloni (denominato EC32/ITA/2011) è stato selezionato ed allineato con il frammento corrispondente del gene *rep* di un pannello rappresentativo di *circovirus* di suino (PCV), di diamante di Gould (FiCV), di canarino (CaCV), di piccione (CoCV), e di pappagallo (BFDV). Gli stipiti di BFDV sono stati selezionati in base alla specie di pappagallo in cui sono stati identificati, in maniera da considerare ciascuna famiglia appartenente all'ordine *Psittaciformes*. Tutte le sequenze utilizzate per l'analisi filogenetica sono riportate nella tabella 1.

Le distanze filogenetiche sono state calcolate secondo il modello Tamura-Nei +Gamma (TN+G). Gli alberi filogenetici sono stati costruiti con il metodo Maximum Likelihood utilizzando il software PHYML con bootstrap calcolato su 1000 repliche non parametriche. La sequenza della porzione del gene *rep* analizzata è stata inserita in GenBank con il numero di accesso JX131620.

## **RISULTATI**

### *Indagini diagnostiche*

I volatili esaminati in sede autoptica apparivano disidratati e sottopeso. All'apertura della cavità toraco-addominale, non venivano riscontrate lesioni macroscopiche di rilievo a parte una leggera ipoplasia della milza ed una lieve degenerazione del fegato. Istologicamente, venivano evidenziati negli epatociti corpi inclusi intranucleari di tipo Cowdry B ed ampie aree di necrosi nel parenchima epatico. Gli esami di laboratorio non hanno evidenziato la presenza di patogeni batterici o parassitari in alcun campione esaminato. Le indagini molecolari per polyomavirus risultavano costantemente negative. Al contrario, dai campioni di fegato e da tutti gli altri campioni esaminati, veniva ottenuto un amplicone di ampiezza corrispondente a quella attesa per *circovirus* (550 bp).

### *Caratterizzazione genetica di circovirus*

I due prodotti di PCR scelti tra quelli ottenuti e provenienti rispettivamente da un riproduttore e dal fegato di un giovane Gould deceduto presentavano sequenze identiche tra loro. Inoltre le analisi di sequenza mediante BLAST hanno permesso di confermare il virus identificato (denominato EC32/ITA/2011) come *circovirus*. Infatti, la sequenza mostrava una correlazione al 97% con quella corrispondente di uno stipite di BFDV (accession number EU810207) identificato in un pappagallo cenerino. Tra le sequenze di *circovirus* presenti in banca dati e considerate per la costruzione dell'albero filogenetico, EC32/ITA/2011 risultava particolarmente correlato a stipiti di BFDV mentre la sequenza

risultava decisamente più distante dalle corrispondenti regioni di FiCV (diamante di Gould) e CaCV (canarino) con un elevato valore di bootstrap. La distanza filogenetica tra EC32/ITA/2011 e FiCV e CaCV risultava rispettivamente pari a 0.535 e 0.564. Al contrario, la distanza media tra le sequenze di EC32/ITA/2011 e quelle provenienti dal gruppo di BFDV era solo di 0.065, con identità nucleotidica variabile tra il 91% (stipite di BFDV identificato in *T. haematodus*) e il 95% (BFDV identificato in *P. erithacus*) (tabella 1).

## DISCUSSIONE

Nel gruppo di diamanti di Gould esaminato è stata diagnosticata un'infezione da *circovirus*. A questa andrebbe attribuita la mortalità osservata tra i giovani, considerate le gravi lesioni necrotiche riscontrate istologicamente a carico del fegato, tipiche in corso di quest'infezione (Todd, 2004).

Le infezioni da *circovirus* sono ben note negli psittacidi ed associate alla PBF (Gerlach, 1994; Todd et al. 2000). Al contrario, per quanto segnalate in specie di volatili differenti non sono in esse ben descritte. Analogamente i quadri clinici e patologici ad esse associati non sono ben noti e definiti. Nel Diamante di Gould, l'infezione da *circovirus* è stata già segnalata (Shivaprasad et al. 2004) ed il virus riscontrato è stato successivamente classificato come nuovo *circovirus* aviare in base all'analisi del gene *rep* (Todd et al. 2007). Il soggetto risultato positivo al virus proveniva da un allevamento di Gould in cui era stata osservata una sindrome respiratoria, caratterizzata da letargia, scolo nasale, grave dispnea e mortalità in percentuali ridotte. Precedentemente, nel diamante mandarino, la presenza di particelle *circovirus*-like era stata associata a necrosi epatica e qualche perdita di penne (Mysore et al. 1995).

Tra le altre specie non psittacidi, *circovirus* è stato associato in passato nei canarini alla "black spot disease", condizione patologica caratterizzata da mortalità neonatale in presenza di distensione addominale e dilatazione della cistifellea (Goldsmith, 1995). Più recentemente, *circovirus* è stato identificato in canarini che manifestavano mortalità accompagnata da sintomi aspecifici quali letargia, anoressia e perdita di peso (Todd et al., 2001). Il virus responsabile è stato poi classificato come nuovo *circovirus* aviare in base alla distanza filogenetica con BFDV ed altri *circovirus* (Phenix et al. 2001). Sarebbe pertanto che, analogamente a quanto osservato in altre specie di volatili non psittacidi (Duchatel et al., 2006; Chen et al. 2003; Todd et al. 2001; Smyth et al., 2005; Stewart et al. 2006), il canarino ed il diamante di Gould non vengano infettati da stipiti di BFDV ma da altri *circovirus* geneticamente ben distinti. Nei non psittacidi inoltre forme cliniche analoghe alla PBF non sono mai state descritte. Le manifestazioni patologiche osservate nel gruppo di diamanti di Gould esaminati sembrerebbero invece molto simili alla PBF. Infatti, nel gruppo colpito sono state osservate lesioni sia a carico del becco che delle penne. In particolare, la maggior parte delle alterazioni erano evidenziabili a carico del becco, che risultava gravemente colpito in particolare nella sua porzione superiore. Tali lesioni sono tipiche della PBF dei pappagalli (Todd, 2004) e relativamente comuni in alcune specie come i cacatua (McOrist et al. 1984; Jacobson et al. 1986). Anche la mancanza di anomalie del becco nei giovani Gould esaminati sembrerebbe un'analogia con quanto accade in corso di infezione da BFDV negli psittacidi. Infatti, generalmente nei pappagalli le infezioni da BFDV sono più gravi quando colpiscono precocemente i soggetti giovani i quali hanno gli organi linfoidi ancora in pieno sviluppo, rendendo così più rapida l'evoluzione della malattia con un tasso di mortalità più elevato in età giovanile

spesso senza la comparsa di lesioni al becco che insorgono più frequentemente nelle evoluzioni croniche (Gerlach, 1994). Analogamente pertanto, i giovani Gould potrebbero esser deceduti prima di manifestare segni clinici esteriori. Le analisi filogenetiche hanno evidenziato una elevata affinità tra le sequenze di EC32/ITA/2011 e di stipti di BFDV, mentre il virus appariva invece molto distante da *circovirus* del canarino (CaCV) e del diamante di Gould (FiCV). Tali riscontri porterebbero a ritenere che l'infezione non sia stata indotta dal *circovirus* specifico del diamante di Gould ma che sia stata determinata dalla diffusione interspecifica di un BFDV di pappagallo ai diamanti stessi, con conseguente sviluppo delle manifestazioni cliniche proprie della PBFD.

## CONCLUSIONI

In questo lavoro viene descritta, in un gruppo di Diamanti di Gould, un'infezione da *circovirus* associata a manifestazioni cliniche tipiche della Malattia del becco e delle penne dei pappagalli. Le lesioni osservate vengono supportate dalle analisi filogenetiche che evidenziano una elevata divergenza tra il virus riscontrato e *circovirus* del diamante di Gould (FiCV) e del canarino (CaCV). Al contrario, il virus risulta particolarmente affine a stipti di BFDV identificati in specie diverse di pappagalli. Si ritiene pertanto che l'infezione osservata sia attribuibile alla trasmissione interspecifica di un ceppo di BFDV dal pappagallo al gruppo di diamanti di Gould. Resta da chiarire come l'infezione possa essersi trasmessa da una specie all'altra.

**Tabella 1. Correlazione in base al gene *rep* della sequenza di EC32/ITA/2011 con i frammenti corrispondenti di *Circovirus* provenienti da specie differenti. Nella prima colonna, per ogni sequenza, è riportato l'accession number in GenBank.**

	Distanza (TN + G) EC32/ITA/2011	Identità nucleotidica EC32/ITA/2011
CaCV AJ301633	0.564	63.13 %
FiCV DQ845075	0.535	64.53 %
PCV1 U49186	1.056	48.50 %
PCV2 AF055392	1.056	50.30 %
CoCV AF252610	0.532	64.53 %
BFDV1 AF311299 Tha	0.102	90.78 %
BFDV2 FJ685979 Csu	0.049	95.39 %
BFDV3 EF457975 Nho	0.073	93.19 %
BFDV4 AY521238 Per	0.048	95.39 %
BFDV AY521235 Aro	0.053	94.99 %

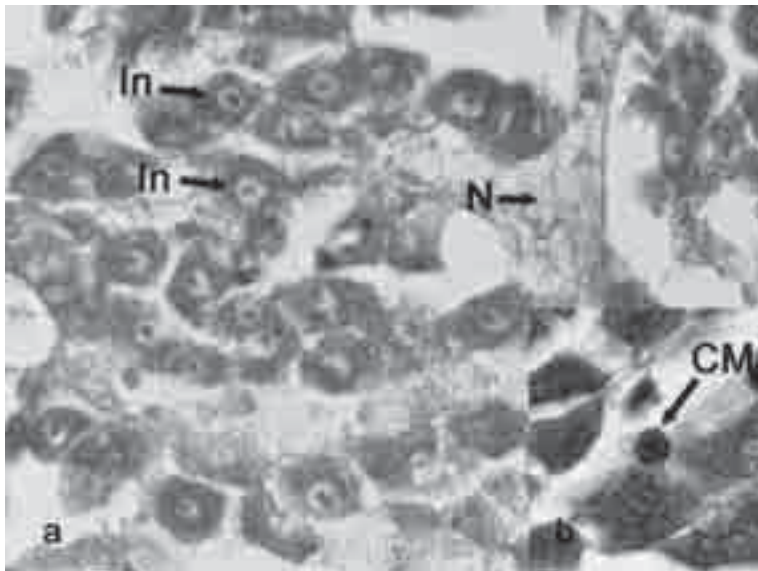
**Legenda:** CaCV: Canary Circovirus; FiCV: Finch Circovirus; PCV: Porcine Circovirus; CoCv: Columbidae Circovirus; BFDV: Beak and Feather Disease Virus; Tha: *Trichoglossus haematodus*; Csu: *Cacatua sulphurea*; Nho: *Nymphicus hollandicus*; Per: *Psittacus erithacus*; Aro: *Agapornis roseicollis*.



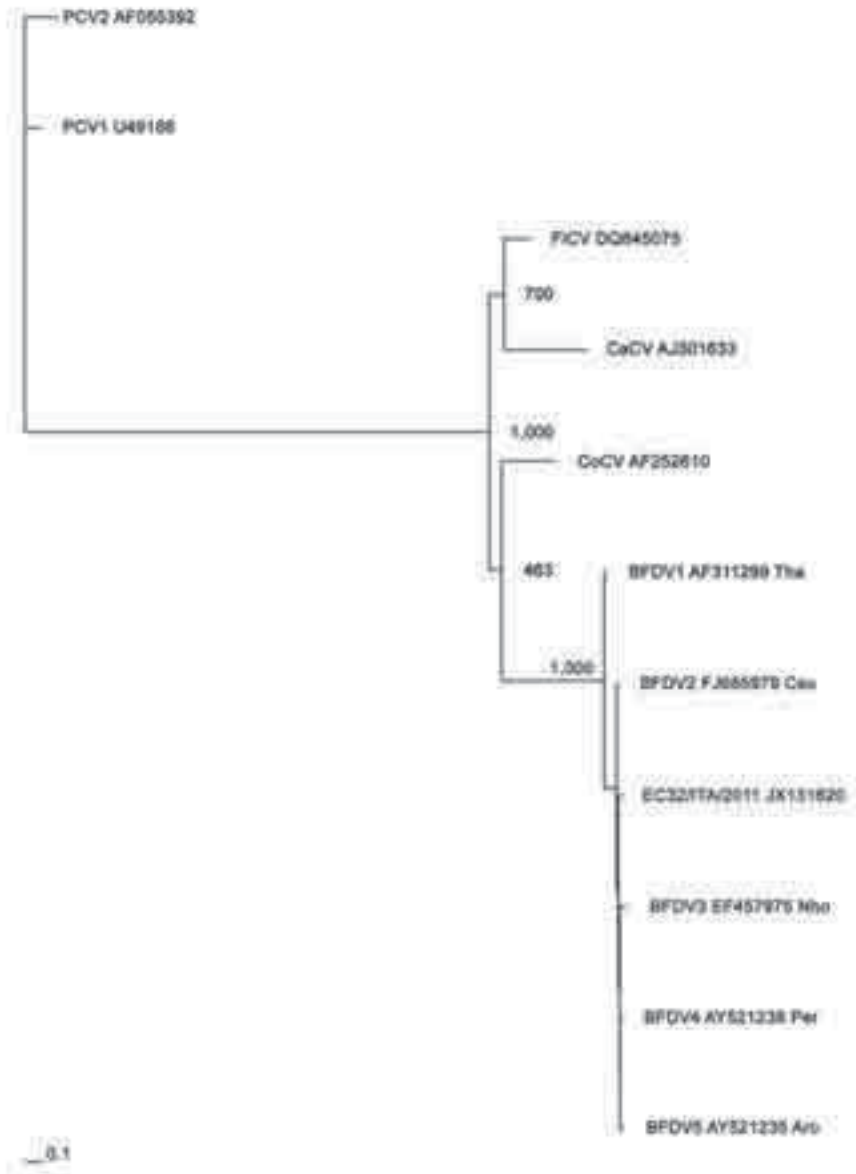
**Figura 1. Lesioni macroscopiche riscontrate in corso di infezione: 1a, 1b: alopecia nella regione della testa ed anomalie del becco; 1c, 1d, 1e: lesioni a carico del becco (N.B. l'aspetto del piumaggio è legato al processo di muta in corso)**



**Figura 2. Sezione istologica di fegato (Ematossilina-eosina; ingrandimento 1000x): 2a: Corpi inclusi intranucleari di tipo Cowdry B (In) ed area di necrosi (N). 2b: marginalizzazione della cromatina (CM).**



**Figura 3. Albero filogenetico sulla base del gene *rep*. Accanto all'acronimo di ogni sequenza è riportato l'accession number e, per gli stipiti, di BFDV, la specie ospite di pappagallo I valori di bootstrap sono indicati agli snodi principali. PCV: Porcine Circovirus; FiCV: Finch Circovirus; CaCV: Canary Circovirus; CoCV: Columbidae Circovirus; BFDV: Beak and Feather Disease Virus; Tha: *Trichoglossus haematodus*; Csu: *Cacatua sulphurea*; Nho: *Nymphicus hollandicus*; Per: *Psittacus erithacus*; Aro: *Agapornis roseicollis*.**



## BIBLIOGRAFIA

1. Cathedral-Ortiz L., Kurenbach B., Massaro M., McInnes K., Brunton D.H., Hauber M.E., Martin D.P., Varsani A. (2010). A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaeseelandiae*) in New Zealand. *Arch Virol.* 155: 613-620.
2. Chen C.L., Chang P.C., Lee M.S., Shein J.H., Ou S.J., Shieh H.K. Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. (2003). *Avian Path.* 32: 165-171.
3. Duchatel J. P., Todd D., Smyth J. A., Bustin J. C., Vindevogel H. Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. (2006). *Avian Path.* 35(1): 30-34.
4. Eisenberg S.W.F., van Asten A.J.A.M., van Ederen A.M., Dorrestein G.M. Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on farm in the Netherlands. (2003). *Vet Microbiol.* 95: 27-38.
5. Gerlach, H., (1994). Circoviridae - Psittacine Beak and Feather Disease Virus, in: Ritchie, B.W., Harrison, J., Harrison, L.R. (Eds.), *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth, pp. 894-902.
6. Goldsmith T. L. (1995). Documentation of passerine circoviral infection (abstract). In *Proceedings of the Annual Conference of the American Association of Avian Veterinarians* pp. 349-350. Philadelphia, PA, USA.
7. Katoh, H., Ogawa, H., Ohya, K., Fukushi, H., (2010). A review of DNA viral infections in psittacine birds. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 1099-1106.
8. Jacobson ER, Clubb S., Simpson C., Walsh M., Lothrop CD Jr, Gaskin J., Bauer J., Hines S., Kollias GV., Poulos P, et al. (1986). Feather and beak dystrophy and necrosis in cockatoos: clinicopathologic evaluations. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* nov 1, 189(9):999-1005.
9. Manarolla G., Liandris E., Pisoni G., Moroni P., Piccinini R., Rampin T. (2007). Mycobacterium genavense and avian polyomavirus co-infection in a European Goldfinch (*Carduelis carduelis*). *Avian Path.* 36(5): 423-426.
10. Mankertz A., Hattermann K., Ehlers B., Soike D. Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. (2000). *Arch. Virol.* 145, 2469-2479.
11. McOrist S., Black DG., Pass DA, Scott PC, Marshall J. (1984). Beak and feather dystrophy in wild sulphur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*). *J Wildlife Dis.* apr. 20(2):120-124.
12. Mysore J., Read D., Duft B., Kinde H., Leger J. S. (1995). Feather loss associated with circovirus-like particles in finches (abstract). In *Proceeding of the Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticatians. Histopathology Section (2)* Reno, NV, USA.
13. Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virol.* 143: 1723-1744.
14. Phenix K.V., Weston J.H., Ypelaar I., Lavazza A., Smyth J.A., Todd D., Wilcox G.E., Radial S.R. (2001). Nucleotide sequence analysis of a novel

- circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *J Gen Virol.* 82: 2805-2809.
15. Rampin T., Manarolla G., Pisoni G., Recordati C. and Sironi G. (2006). Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Path* 35(4): 277-279.
  16. Shivaprasad H. L., Woolcock P.W., Castro A.E., Chin R.P., Nordhausen R.W., Meteyer C.U., Jeffrey J.S., Barr B.C., Droual R. (1993). Identification of viruses from the intestine of ostriches. In Proceedings of the 36th Annual Meeting, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (p. 107). Las Vegas, NV, USA.
  17. Shivaprasad H.L., Daphne H., Todd D., Smyth J.A. (2004). Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Path.* 33(5): 525-529.
  18. Smyth J., Soike D., Moffett D., Weston J.H., Todd D. (2005). Circovirus-infected geese studies by *in situ* hybridation. *Avian Path.* 34(3), 227-232.
  19. Stewart M. E., Perry R., Raidal S. R. (2006). Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Path.* 35(2): 86-92.
  20. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
  21. Todd D. (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Path.* 29: 373-394.
  22. Todd. D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. (2001). Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology.* 286: 354-362.
  23. Todd, D., (2004). Avian circovirus diseases: lesson for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.* 98: 169-174.
  24. Todd, D., Weston, J., Ball, N.W., Borghmans, B.J., Smyth, J.A., Gelmini, L., Lavazza, A., (2001). Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathol.* 30: 321-325.
  25. Todd D., Scott N.J., Fringuelli H.L., Shivaprasad D., Gavier-Widen., Smyth J.A. (2007). Molecular characterization of novel circoviruses from finch and gull. *Avian Pathol.* 36(1): 75-81.
  26. Todd D., Fringuelli E., Scott A. N., Borghmans B. J., Duchatel J. P., Shivaprasad H.L., Raidal S. R., Abadie J. X., Franciosi M. P., Smyth J. A. (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Res Vet Sci.* 84(2): 311- 319.
  27. Varsani, A., de Villiers, G.K., Regnard, G.L., Bragg, R.R., Kondiah, K., Hitzeroth, I.I., Rybicki, E.P., (2010). A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Arch. Virol.* 155: 435-439.

## VALUTAZIONE ZOO-ECONOMICA DELL'USO DI UN VACCINO VIVO ANTICOCCIDICO IN ROTAZIONE AI COCCIDIOSTATICI NEI POLLI DA CARNE: RISULTATI DI UNA SERIE DI PROVE DI CAMPO IN BELGIO E IN OLANDA

Dardi M.<sup>1</sup>, De Gussem M.<sup>2</sup>, Van Mullem K.<sup>2</sup>, Van Meirhaeghe H.<sup>2</sup>, Vandenbussche N.<sup>3</sup>, Pagès M.<sup>1</sup>, Rubio J.<sup>1</sup>

*Laboratorios Hipra S.A., Avda. la Selva 135, 17170 Amer (Girona), Spagna.  
E-mail: [martina.dardi@hipra.com](mailto:martina.dardi@hipra.com).*

<sup>2</sup> *Vetworks, Knokstraat 38, B-9880 Poeke, Flanders, Belgio.*

<sup>3</sup> *Degudap, Sasstraat 10, B-8870 Izegem, Flanders, Belgio.*

Nella produzione industriale di pollame, l'organizzazione di un programma di prevenzione per il controllo della coccidiosi è una delle decisioni più importanti da prendere per salvaguardare o migliorare i risultati zootecnici ed economici. I vaccini anticoccidici stanno diventando sempre più popolari perché molto spesso forniscono una soluzione laddove i coccidiostatici nel mangime hanno presumibilmente perso di efficacia a seguito dell'instaurarsi di fenomeni di resistenza nei ceppi di *Eimeria* di campo (Williams, 2002; Mathis & Broussard, 2006; Peek & Landman 2011). Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'efficacia di un vaccino anticoccidico (Hipracox Broilers®), somministrato mediante spray a goccia grossa il primo giorno di vita all'arrivo in allevamento, per prevenire e controllare le coccidiosi cliniche in polli da carne in condizioni di produzione standard. Inoltre, è stato stimato l'impatto zootecnico dei cicli prima, durante e dopo la vaccinazione, con il ritorno ai coccidiostatici nel mangime. In totale sono stati valutati i dati zootecnici relativi a circa 450.000 animali per l'allevamento 1, mentre per l'allevamento 2 di circa 960.000 animali. La mortalità media prima della vaccinazione era del 3,13%. Durante la vaccinazione è scesa al 2,67%, con un miglioramento del 14,7%, mentre dopo la vaccinazione la mortalità è salita al 2,91%, ma rappresenta ancora un miglioramento del 7,03% rispetto alla situazione presente prima della vaccinazione. Dal momento che le età di macellazione finale hanno presentato delle differenze, i pesi medi finali sono stati corretti alla stessa età (41 giorni). Il peso vivo medio prima della vaccinazione era di 2409 grammi, mentre dopo la vaccinazione era di 2491 grammi: un aumento di 82 grammi. L'indice di conversione alimentare (ICA) è stato corretto per un peso di 2000 grammi per poter mettere a confronto l'ICA di gruppi con pesi finali diversi. L'ICA<sub>2000</sub> durante la vaccinazione migliora di 2 punti e dopo la vaccinazione di un miglioramento di 8 punti. Analizzando i dati della media dell'ICA<sub>2000</sub> rispettivamente dei cicli prima, durante e dopo la vaccinazione usando l'analisi di varianza a una via (ANOVA), sono state riscontrate differenze statisticamente significative con  $P \leq 0,05$ . Nei cicli prima della vaccinazione si è riscontrato un IPG medio di 58,39 grammi, mentre nei cicli durante la vaccinazione era inferiore: 58,04 grammi. Nei cicli dopo la vaccinazione si è riscontrato un miglioramento di 2,21 grammi, con un risultato

1 Laboratorios Hipra S.A., Avda. la Selva 135, 17170 Amer (Girona), Spagna. E-mail: [martina.dardi@hipra.com](mailto:martina.dardi@hipra.com).

2 Vetworks, Knokstraat 38, B-9880 Poeke, Flanders, Belgio.

3 Degudap, Sasstraat 10, B-8870 Izegem, Flanders, Belgio.

medio di 60,60 grammi. Analizzando i dati della media dell'IPG rispettivamente dei cicli prima, durante e dopo la vaccinazione usando l'analisi di varianza a una via (ANOVA), sono state riscontrate differenze statisticamente significative con  $P \leq 0,05$ . Il valore medio del Fattore europeo di efficienza produttiva (EPEF) prima della vaccinazione era pari a 362, mentre durante la vaccinazione l'EPEF è passato a 370: il miglioramento è stato di 8 punti. Infine, dopo la vaccinazione l'EPEF è migliorato di 37 punti in confronto ai valori relativi a prima della vaccinazione. Realizzando l'analisi di varianza a una via (ANOVA), è stato riscontrato che la media dell'EPEF rispettivamente dei cicli prima, durante e dopo la vaccinazione avevano differenze statisticamente significative con  $P \leq 0,05$ . L'uso di antibiotici non è stato superiore, in termini di kg di prodotto attivo, durante la vaccinazione rispetto ai cicli realizzati prima della vaccinazione in entrambi gli allevamenti. La differenza principale tra i cicli realizzati prima e durante la vaccinazione è rappresentata dall'età del primo trattamento: circa una settimana prima per i cicli vaccinati, quindi, la quantità totale di antibiotici viene ridotta da trattamenti realizzati in età precoce.

In generale possiamo concludere che non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i cicli realizzati prima e durante la vaccinazione in nessuno dei parametri produttivi analizzati. Al contrario, i risultati assoluti di mortalità,  $ICA_{2000}$  ed EPEF sono migliorati durante la vaccinazione. Dopo la vaccinazione, i risultati assoluti sono migliori per tutti i parametri (fatta eccezione per la mortalità, per la quale i risultati migliori si hanno durante la vaccinazione), mentre IPG,  $ICA_{2000}$  ed EPEF sono statisticamente migliori rispetto a quelli riscontrati prima e durante la vaccinazione. Per questa ragione, sembra chiaro che la vaccinazione contro la coccidiosi promuova il ritorno alla sensibilità dei ceppi di campo di *Eimeria* verso i coccidiostatici. In conclusione, per il tipo di allevamenti utilizzati durante la prova, la vaccinazione contro la coccidiosi con Hipracox® si è rivelata un approccio economicamente valido sia durante la vaccinazione, ma soprattutto dopo il ritorno ai coccidiostatici somministrati nel mangime.

## **IMPIEGO DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV) COME POSSIBILE VACCINO VIVO RICOMBINANTE PER L'ESPRESSIONE DI PROTEINE IMMUNOGENE DEL CORONAVIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA**

Falchieri M.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>3</sup>, Listorti V.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Kontolaimou M.<sup>2</sup>, Naylor C.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Infection Biology Institute of Infection and Global Health - Faculty of Health and Life Sciences, Leahurst Campus, University of Liverpool CH64 7TE - UK;*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna - Via Tolara di Sopra, 50 40064 Ozzano Emilia (BO) - Italia;*

<sup>3</sup>*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16; 35020 Legnaro (PD), Italia.*

### **Summary**

The study investigates the ability of subtype A Avian metapneumovirus (AMPV) to accept foreign genes and be used as a vector for delivery of Infectious bronchitis virus (IBV) QX genes to chickens. Initially the GFP gene was added to AMPV at all gene junctions in conjunction with the development of cassetted full length DNA AMPV copies. After 3 recombinant viruses had been recovered by reverse genetics, GFP positions supporting gene expression while maintaining virus viability *in vitro*, were determined. Subsequently, either S1 or nucleocapsid (N) genes of IBV were positioned between AMPV M and F genes, while later a recombinant was prepared by inserting S1 and N at AMPV MF and GL junctions respectively. Immunofluorescent antibody staining showed that all recombinants expressed the inserted IBV genes *in vitro* and furthermore, all recombinant viruses were found to be highly stable during serial passage. Eyedrop inoculation of chickens with some AMPV-IBV recombinants at one-day-old induced protection against virulent IBV QX challenge 3 weeks later, as assessed by greater motility of tracheal cilia from chickens receiving the recombinants. Nonetheless evidence of AMPV/IBV seroconversion, or major recombinant tracheal replication, were largely absent.

### **INTRODUZIONE**

*Avian metapneumovirus* (AMPV) è un virus ad RNA appartenente alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al genere *Metapneumovirus*. E' causa nel tacchino di un'infezione delle prime vie respiratorie, mentre nel pollo è responsabile di forme respiratorie più lievi. Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di AMPV (A, B, C e D), diversi tra loro dal punto di vista genetico, biologico e sierologico. Il genoma di AMPV comprende 8 geni (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') ed ha una lunghezza di circa 13.5 kb (Easton *et al.*, 2004). Tecniche di *reverse genetics* (RG), recentemente messe a punto per AMPV sottotipo A (Naylor *et al.*, 2004) e C (Govindarajan *et al.*, 2006) hanno fornito uno strumento prezioso per la modifica *in vitro* del genoma virale e sono state sino ad ora utilizzate per vari scopi. Utilizzando la RG sono stati prodotti *in vitro* AMPV ricombinanti con mutazioni puntiformi, delezioni o inserzioni di geni reporter; di questi virus è stata inoltre valutata la capacità replicativa *in vivo* (Govindarajan *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2008; Naylor *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2011). Al momento non sono però

ancora disponibili informazioni sulla capacità del genoma di AMPV di accettare geni eterologhi appartenenti ad altri agenti virali, né sulla stabilità genetica del genoma di AMPV in tal modo modificato.

Il presente studio riporta l'inserzione nel genoma di AMPV di due diversi geni del *Coronavirus* agente eziologico della Bronchite infettiva (IBV). Si tratta di uno dei principali patogeni del pollo che, come AMPV, primariamente colpisce il tratto respiratorio, anche se è in grado di causare malattia anche a livello dell'apparato renale e riproduttivo. Il ceppo di IBV utilizzato in questo studio appartiene al genotipo QX, variante di recente emergenza in Europa (Worthington and Jones, 2008) e causa di notevoli perdite economiche per la sua capacità di eludere la risposta immunitaria stimolata dai vaccini attualmente in uso. In particolare sono stati scelti il gene S1 che codifica per l'omonima proteina di superficie, principale determinante antigenico di IBV (Cavanagh, 2007), ed il gene N che codifica per la proteina del nucleocapside. Di quest'ultima è stata già dimostrata la capacità d'indurre immunità protettiva (Seo *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2010).

Per verificare in quale posizione del genoma l'espressione di proteine eterologhe sia maggiore, inizialmente sono stati prodotti AMPV ricombinanti codificanti la *Green Fluorescent Protein* (GFP), che è stata inserita nelle diverse regioni intergeniche disponibili. Successivamente sono stati preparati diversi AMPV ricombinanti codificanti per le proteine S1 e/o N di IBV. I virus ricombinanti ottenuti sono stati inoculati in polli SPF in due diversi esperimenti per valutare la loro capacità d'indurre una risposta immunitaria protettiva in seguito ad infezione sperimentale con IBV mediante il test della motilità ciliare. La replicazione virale è stata valutata mediante real time RT-PCR (qRT-PCR) e la risposta immunitaria umorale specifica per IBV ed AMPV mediante test ELISA ed inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

## MATERIALI E METODI

### **Inserzione di GFP nel genoma di AMPV**

Il plasmide contenente la copia in DNA (cDNA) dell'intero genoma di un ceppo AMPV sottotipo A (virus A) è stato modificato mediante la metodica di *site direct mutagenesis* in modo tale da inserire un sito di restrizione in ciascuna regione intergenica non codificante. Sono così stati ottenuti 7 plasmidi, ciascuno con il sito di restrizione in posizione differente corrispondente alle 7 regioni intergeniche. Dopo taglio enzimatico è stato inserito in ogni cDNA il gene che codifica per GFP. L'avvenuta ligazione, dopo trasformazione batterica, è stata verificata mediante screening delle singole colonie con specifiche PCR e successivo sequenziamento.

I virus ricombinanti sono stati ottenuti utilizzando la metodica di *reverse genetics* per AMPV messa a punto da Naylor *et al.* (2004). L'espressione della GFP è stata confermata mediante osservazione di fluorescenza al microscopio UV. La replicazione virale è stata valutata come titolo massimo ottenuto su cellule Vero dopo tre passaggi.

### **Inserzione dei geni S1 e/o N di IBV nel genoma di AMPV**

Tre ceppi AMPV sottotipo A, a diverso grado di virulenza (denominati nel presente lavoro: vA; AvF e 309/04) sono stati utilizzati per preparare i plasmidi vettori nei quali inserire i gene S1 e/o N di IBV genotipo QX. L'inserzione del o dei geni nel genoma AMPV e la preparazione dei ricombinanti è stata eseguita seguendo le metodiche in



precedenza riportate per i ricombinanti AMPV GFP. In totale sono stati ottenuti 7 AMPV ricombinanti (Tabella 1). Per verificare la trascrizione del gene S1 e/o N inseriti sono state eseguite RT-PCRs specifiche per l'RNA messaggero (mRNA) (Brown *et al.*, 2011), mentre per verificare l'espressione delle proteine è stata eseguita immunofluorescenza (IF) su cellule Vero infettate con gli AMPV ricombinanti.

### **Prova *in vivo* di protezione al challenge con IBV**

Per verificare la capacità immunogena nei confronti di IBV dei ceppi ricombinanti, sono state eseguite due prove sperimentali su polli SPF in condizioni di isolamento biologico.

*Prova sperimentale 1.* Settanta polli SPF di un giorno di vita sono stati suddivisi in 7 gruppi di 10 animali ciascuno. Nei primi 4 gruppi, gli animali sono stati inoculati per via oculare rispettivamente con i ceppi ricombinanti: A<sub>full S1 MF</sub>, A vF<sub>full S1 MF</sub>, A<sub>del S1 MF</sub> e A vF<sub>del S1 MF</sub> alla dose di  $4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>. Un gruppo di controllo è stato inoculato con il ceppo AMPV AvF non modificato. Due altri gruppi sono stati tenuti come controllo, rispettivamente positivo e negativo, e sono stati inoculati con acqua sterile. Tre settimane dopo è stato eseguito il challenge come descritto più avanti.

*Prova sperimentale 2.* Sessanta polli SPF di un giorno di vita sono stati suddivisi in 6 gruppi di 10 animali ciascuno. Quattro di questi gruppi sono stati inoculati con i ceppi ricombinanti 309<sub>full S1 MF</sub>, A vF<sub>full S1 MF + N GL</sub>, A vF<sub>N MF</sub> and A vF<sub>full S1 MF</sub> per via oculare alla dose  $4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>. I rimanenti due, tenuti come gruppi di controllo positivo e negativo, sono stati inoculati con acqua sterile.

Ventuno giorni dopo la vaccinazione (g.p.v.), tutti i gruppi, eccetto il gruppo di controllo negativo, sono stati sottoposti a challenge con un ceppo IBV genotipo QX alla dose di  $4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>.

Al 4° ed al 6° giorno post infezione (g.p.i.) cinque animali per gruppo/giorno sono stati soppressi per prelevare la trachea e valutare la motilità ciliare (vedi paragrafo seguente). In entrambe le prove, gli animali sono stati quotidianamente monitorati per eventuale comparsa di sintomatologia clinica, sia post-vaccinazione che post-infezione.

Al 18° g.p.v., dagli animali sono stati prelevati campioni di sangue da sottoporre a test ELISA per IBV e AMPV e a test HI per IBV. A 3, 6, 9 g.p.v. sono stati eseguiti tamponi rinofaringei per valutare la replicazione *in vivo* dei ricombinanti mediante qRT-PCR (Cecchinato *et al.*, 2011).

### **Valutazione della motilità ciliare**

L'inoculazione di polli SPF con ceppi IBV di campo provoca infezione e danno dell'epitelio ciliare tracheale, che si può evidenziare al microscopio ottico con la perdita della motilità ciliare. Considerando questa caratteristica, la protezione indotta da un vaccino per IBV è misurabile dal mantenimento della motilità ciliare delle sezioni tracheali ottenute dai soggetti sottoposti ad infezione di prova (Frangipane and Jungback, 2004). La Farmacopea Europea prende proprio questo metodo come test di riferimento per la valutazione della protezione vaccinale per IBV.

In entrambe le prove sperimentali, al 4° e 6° g.p.i., dalle trachee prelevate dagli animali soppressi, sono state ottenute sezioni trasversali dello spessore di 1mm. Da ogni trachea sono stati selezionati 10 anelli (3 prelevati dalla parte prossimale, 4 dalla parte media e 3 dalla parte distale della trachea) ed esaminati al microscopio ottico rovesciato per determinarne la presenza/assenza di attività ciliare.

I risultati della motilità ciliare dei gruppi sperimentali sono stati analizzati mediante test *chi-quadro*; differenze con  $p < 0.05$  sono considerate significative.

## **RISULTATI**

### **Caratterizzazione dei ricombinanti AMPV+GFP**

Sono stati ottenuti 7 virus ricombinanti ciascuno con il gene GFP inserito in una diversa regione intergenica. La maggiore replicazione virale (espressa come  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml in cellule VERO) si è ottenuta con i ricombinanti in cui il gene GFP era inserito in regioni a valle del genoma virale. Quando il GFP è stato inserito a monte del genoma (fra i geni N e P) il titolo è risultato di 2,1  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, mentre in tutte le altre posizioni ha superato 4  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, mostrando un picco massimo di 5  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml nella posizione fra M ed F. Nei monostrati cellulari in cui i ricombinanti sono stati ottenuti e replicati si è sempre osservata un'intensa fluorescenza legata all'espressione di GFP.

### **Caratterizzazione dei ricombinanti AMPV+IBV**

I geni di IBV sono stati inseriti con successo nel cDNA. Da questi, mediante RG, sono stati ottenuti virus ricombinanti la cui presenza è stata resa evidente dall'effetto citopatico tipico di AMPV determinato nelle cellule Vero. RT-PCR sull'RNA messaggero virale ha confermato l'avvenuta trascrizione nei ricombinanti del gene S1 e/o N di IBV. L'espressione delle proteine S1 e/o N di IBV è stata confermata per tutti i ricombinanti mediante immunofluorescenza.

### **Sierologia e qRT-PCR**

In generale non è stata rilevata risposta anticorpale significativa per IBV e AMPV nei gruppi sperimentali, sia con HI che con ELISA. La qRT-PCR per AMPV ha mostrato minima replicazione per tutti i virus ricombinanti con la sola eccezione del 309<sub>full S1 MF</sub> che ha mostrato capacità di replicarsi nella maggior parte degli animali (Tabella 2).

### **Motilità ciliare dopo l'infezione di prova**

Al 4° g.p.i. in tutte le sezioni tracheali ottenute dai gruppi sperimentali sottoposti ad infezione di prova, sia inoculati con i ricombinanti che di controllo, si è evidenziata ciliostasi completa.

Al 6° g.p.i., qualche sezione di trachea di animali vaccinati con ricombinanti ha mostrato motilità ciliare. Ciò è stato osservato nei gruppi AvF<sub>full S1 MF+N GL'</sub>, AvF<sub>N MF</sub> ed A<sub>S1 MF?</sub> con percentuali decrescenti dal primo all'ultimo (Tabella 2). Le percentuali di motilità osservate in questi gruppi differivano significativamente rispetto a quelle osservate nei gruppi di controllo ( $p < 0.05$ ).

### **Segni clinici e lesioni macroscopiche**

Non è stata mai osservata sintomatologia clinica post-vaccinazione.

Al 6° g.p.i. nella prova 1, sono stati osservati sintomi clinici in un soggetto del gruppo di controllo positivo e due del gruppo AvF. L'esame necroscopico di questi soggetti ha evidenziato lesioni renali tipiche dell'infezione da IBV genotipo QX.

## **CONCLUSIONI**

Il presente studio ha dimostrato la possibilità di generare ricombinanti AMPV sottotipo A in grado di veicolare il gene reporter GFP e geni eterologhi di IBV, ed esprimere

in modo stabile le corrispondenti proteine. Alcuni dei ceppi AMPV-IBV ricombinanti ottenuti, se inoculati in polli SPF al primo giorno di vita, sono stati in grado di conferire un certo grado di protezione al challenge con IBV genotipo QX. Tuttavia l'assenza di risposta immunitaria specifica e lo scarso titolo virale dei ricombinanti nelle prime vie respiratorie, indicano che il livello di replicazione virale è in genere molto scarso. Saranno necessari ulteriori approfondimenti volti a comprendere quali siano i fattori essenziali per l'induzione di una protezione efficace nei confronti di IBV e a migliorare le performance di AMPV come vettore di geni eterologhi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Brown PA, Lupini C, Catelli E, Clubbe J, Ricchizzi E and CJ Naylor. (2011).. A single polymerase (L) mutation in avian metapneumovirus increased virulence and partially maintained virus viability at an elevated temperature. *Journal of General Virology* 92:346-354.
2. Cavanagh D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research* 38:281- 297.
3. Cecchinato M, Lupini C, Mondin A, Muñoz Pogoreltseva OS, Listorti V and E Catelli. (2011). Development of Real Time RT-PCR Tests for Detection and Differentiation of Avian Metapneumovirus. 17th World Veterinary PoultryCongress – Proceedings, Cancun, México, 14-16 August 2011:334-341.
4. Easton AJ, J. Domachowske B, and HF Rosenberg. (2004). Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clinical Microbiology Review* 17:390-412.
5. Frangipani J A, and C Jungback. (2004). Immunogenicity testing of vaccines against Avian Infectious Bronchitis - Comparison of several methods to demonstrate experimental infection. Proceedings IV International Symposium on Avian Corona- and Pneumovirus Infections: 202 - 212.
6. Govindarajan D, Buchholz UJ and SK Samal. (2006). Recovery of avian metapneumovirus subgroup C from cDNA: cross-recognition of avian and human metapneumovirus support proteins. *Journal of Virology* 80:5790-5797.
7. Ling R, Sinkovic S, Toquin D, Guionie O, Etteradossi N and AJ Easton. (2008). Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *Journal of General Virology* 89:525-533.
8. Naylor CJ, Brown PA, Edworthy N, Ling R, Jones RC, Savage CE and AJ Easton. (2004). Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology* 85:3219-3227.
9. Naylor CJ, Lupini C and P Brown. (2010). Charged amino acids in the AMPV fusion protein have more influence on induced protection than deletion of the SH or G genes. *Vaccine* 28:6800 - 6807.
10. Seo SHW, Smith LR and EW Collisson. (1997). The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T- lymphocytes and protects chickens from acute infection. *Journal of Virology* 71:7889-7894.

11. Worthington KJ, Currie RJ and RC Jones . (2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology* 37:247-257.
12. Yu D, Han Z, Xu J, Shao Y, Li H, Kong X and S. Liu. (2010). A novel B-cell epitope of avian infectious bronchitis virus N protein. *Viral Immunology* 23:189-199.

**Tabella 1.** AMPV ricombinanti codificanti geni di IBV.

Nome ricombinante	AMPV d'origine	Inserito IBV QX	Regione intergenica
A <sub>del S1 MF</sub>	A	S1*	MF
A <sub>full S1 MF</sub>	A	S1	MF
A vF <sub>del S1 MF</sub>	A vF	S1*	MF
A vF <sub>full S1 MF</sub>	A vF	S1	MF
A vF <sub>N MF</sub>	A vF	N	MF
A vF <sub>full S1 MF + N GL</sub>	A vF	S1+ N	MF + GL
309 <sub>full S1 MF</sub>	309/04	S1	MF

\* il gene S1 inserito mostrava una delezione di 15 nt

**Tabella 2.** Risultati della sierologia, della qRT-PCR e della motilità ciliare della prove sperimentali.

Gruppo	AMPV qRT PCR (g.p.v. <sup>1</sup> )	Sierologia (18 g.p.v.)			% anelli tracheali con motilità ciliare (g.p.i. <sup>2</sup> )				
		AMPV		IBV	4	6			
		3	6	9			ELISA	HI	ELISA
Prova sperimentale 1	A <sub>del S1 MF</sub>	4/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.*	0	20
	A <sub>full S1 MF</sub>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.	0	24
	A vF <sub>del S1 MF</sub>	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	n.e.	0	0
	A vF <sub>full S1 MF</sub>	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	n.e.	0	0
	A vF	0/10	0/10	5/10	2/10	0/10	n.e.	0	0
	C +	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.	0	0
	C -	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.	100	98
Prova sperimentale 2	A vF <sub>N MF</sub>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0	32
	A vF <sub>full S1 MF + N GL</sub>	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0	40
	309 <sub>full S1 MF</sub>	6/10	8/10	6/10	3/10	0/10	0/10	0	8
	A vF <sub>full S1 MF</sub>	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0	2
	C +	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0	4
	C -	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	100	100

1 giorni post vaccinazione

2 giorni post infezione

\* non eseguito

# **PREVALENZA DEI PORTATORI ASINTOMATICI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEI POLLI REGOLARMENTE MACELLATI, VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA DEI CEPPI ISOLATI: RISULTATI PRELIMINARI**

Fiorentini L.<sup>1</sup>, Lilliu E.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Taddei R.<sup>1</sup>, Lontani B.<sup>2</sup>, Gaspari P.<sup>2</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

*1-Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna  
sezione diagnostica di Forlì*

*2- Azienda unità sanitaria locale di Cesena, dipartimento di sanità pubblica, U.O.  
igiene alimenti di origine animale*

## **Summary**

In order to study the prevalence of the enteric infection of *Listeria* spp. in broiler chickens a study was carried out in a slaughterhouse during 2011. The study was performed on 50 flocks. The overall prevalence of the enteric *Listeria* spp. infection was 82% of the tested flocks. The prevalence of the *Listeria monocytogenes* infection was 6% of the tested flocks. In the second part of the study the *in-vitro* susceptibility of the isolated strains to 15 antibiotics was carried out.

All isolated strains of *L. innocua*, *L. welshimeri* and *L. monocytogenes* were fully susceptible to amoxicillin, doxycycline, tetracycline, neomycin and colistin and to lincomycin/spectinomycin and trimethoprim/sulphonamides combinations. 3 of 28 *L. innocua* isolated strains and 1 of 3 *L. monocytogenes* isolated strains were resistant to oxacillin. The antimicrobial susceptibility of the *L. grayi* isolated strains and of the *L. ivanovii* isolated strains showed a considerable variability and a resistance to the most tested antibiotics.

## **INTRODUZIONE**

La direttiva 2003/99/CE prevede la raccolta di dati rilevanti e confrontabili su zoonosi, agenti zoonotici, antibiotico-resistenza e casi di tossinfezione alimentare. Sulla base di alcuni studi epidemiologici (European Food Safety Authority – EFSA-2005, 2006, 2007) i dati relativi al livello di contaminazione degli alimenti da *Listeria monocytogenes* oscillano tra 0-48% in prodotti a base di carne e tra 0-40% in prodotti a base di carne di origine avicola (9). Il rapporto EFSA 2008 segnala, rispetto al 2007, un calo del 11% dei casi di infezione da *Listeria* spp. con 1381 casi confermati. Anche se meno frequenti nell'uomo rispetto a *Campylobacter* e *Salmonella*, *Listeria* è nota per causare un alto tasso di mortalità, che colpisce in particolar modo i gruppi vulnerabili come gli anziani. Per quanto riguarda gli alimenti, per la *Listeria* vengono riscontrati livelli superiori ai limiti di sicurezza previsti per legge in alcuni alimenti pronti al consumo, soprattutto nel pesce affumicato, nei prodotti a base di carne sottoposti a trattamento termico e nei formaggi (4,11).

Sono pochi i dati pubblicati sulla prevalenza dell'infezione nelle specie avicole. Com'è noto i casi di listeriosi aviare (intesa come malattia clinicamente manifesta) sono estremamente rari. Tuttavia le specie avicole possono fungere da portatori asintomatici di *Listeria* spp. a livello intestinale e rappresentare una fonte di contaminazione delle carcasse e degli ambienti di lavorazione durante il processo di macellazione (5). Il primo scopo di questo studio è la valutazione della prevalenza

dell'infezione intestinale da *Listeria* spp. nel pollo da carne. Lo studio si prefigge inoltre la valutazione *in vitro* della sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici isolati, includendo quelle classi farmaceutiche utilizzate come terapia d'elezione per la listeriosi umana.

L'area d'indagine è rappresentata da popolazioni di broiler macellati in Emilia Romagna.

## **Materiali e metodi**

### *Campionamento*

I prelievi venivano effettuati in un macello avicolo industriale dell'Emilia Romagna dove annualmente vengono macellati 33.000.000 di polli e 6.000.000 di tacchini in filiera integrata. Si tratta di un macello completamente automatizzato. Il sistema di stordimento delle carcasse è a gas (CO<sub>2</sub>) ed il sistema di eviscerazione è meccanico. Le carcasse, previa eviscerazione, seguono il processo di sezionamento fino al prodotto finito (carni fresche, preparazioni e prodotti a base di carne).

Lo studio veniva condotto nel 2011 per complessivi 11 mesi di attività. Il numero totale di campioni era costituito da 50 lotti (Lotto = partita di polli da carne allevati nello stesso gruppo e condotti al macello lo stesso giorno). Le partite da campionare, definite nella "fase pilota" del progetto, provenivano da 13 diverse province distribuite su tutto il territorio nazionale. Ogni lotto veniva prelevato in sala di eviscerazione ed era costituito da 10 soggetti scelti casualmente. Da ciascuno di essi venivano prelevati i ciechi integri che venivano immediatamente trasferiti in contenitori sterili e in condizioni di refrigerazione.

### *Prove microbiologiche*

Da ciascun intestino venivano prelevati 25 g di contenuto cecale. I campioni venivano sottoposti ad analisi per la ricerca di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* secondo la metodica ISO 11290-1 (6,8,10) che prevede le fasi seguenti:

- primo arricchimento in brodo selettivo Half Fraser inoculato con il campione in esame
- secondo arricchimento in brodo selettivo Fraser
- Isolamento in terreni solidi selettivi Agar *Listeria* Ottaviani e Agosti (ALOA) e Oxford agar
- selezione e trapianto delle colonie sospette
- identificazione microbiologica e biochimica delle colonie trapiantate

### *Valutazione della sensibilità agli antibiotici*

Venivano condotte prove *in vitro* di sensibilità agli antibiotici dei ceppi isolati attraverso la tecnica della Minima Concentrazione Inibente (MIC) (1). Per la prova veniva impiegato un sistema standardizzato MIC AVIPRO PLATE<sup>®</sup> progettato per la medicina veterinaria ed in particolare, per la patologia aviaria, costituito da pannelli (piastre microtiter a 96 pozzetti) contenenti 1µg di diversi antibiotici disidratati impiegati in campo umano e veterinario (15 molecole), progettato per determinare la minima concentrazione inibente nei confronti di batteri gram positivi e gram negativi. Per la definizione della sensibilità nei confronti di penicilline, amoxicillina e dell'associazione trimetoprim/sulfametossazolo venivano considerati i breakpoints forniti dal Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Negli altri

casi, non avendo a disposizione valori-soglia predefiniti per *Listeria monocytogenes*, venivano considerati i criteri definiti dal CLSI per gli stafilococchi coagulasi positivi (2-3). A tale scopo, veniva considerato come controllo un ceppo di referenza di *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). (7)

Veniva allestito un inoculo per ciascuno dei ceppi in esame di *Listeria Spp.* a partire da un'emulsione batterica in 3 ml di acqua distillata con torbidità standard McFarland al solfato di bario 0.5. In seguito la metodica prevedeva le fasi seguenti:

- Centrifugazione della sospensione per 2-3 secondi.
- Inoculazione di 100 µl di sospensione standardizzata in 11 ml di Mueller Hinton Broth.
- Inoculazione di tutti i pozzetti del pannello MIC AVIPRO PLATE® con 100 µl di sospensione batterica per pozzetto.
- Incubazione per 18-24 ore a 37°C in aerobiosi.
- Lettura dei risultati: la MIC veniva calcolata in base all'ultimo pozzetto che mostrava inibizione della crescita. In caso di crescita batterica in tutte le concentrazioni di antibiotico le MIC venivano definite come maggiori-uguali ( $\geq$ ) rispetto alla concentrazione più alta. Quando non si verificava crescita batterica in tutte le concentrazioni, le MIC venivano registrate come minori o uguali ( $\leq$ ) rispetto alla concentrazione più bassa.

#### *Elenco degli antibiotici*

- |                            |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|
| • Amoxicillina             | • Oxacillina                    |
| • Colistina                | • Penicillina G                 |
| • Doxiciolina              | • Tetraciclina                  |
| • Enrofloxacin             | • Tiamulina                     |
| • Eritromicina             | • Tilmicosina                   |
| • Lincomicina              | • Tilosina                      |
| • Lincomicina/Spectinomina | • Trimethoprim/sulfametossazolo |
| • Neomicina                |                                 |

### **Risultati**

#### *Studio di prevalenza*

Su 500 campioni di feci analizzate, il 71% risultava negativo, la restante percentuale (29%), risultava positiva per *Listeria* così distribuita: (Grafico 1.)

*L. innocua* 24,2%

*L. grayi* 3,2%

*L. monocytogenes* 1%

*L. welshimeri* 1%

*L. ivanovii* 0,2%

Su 50 lotti analizzati, 41 di essi (pari all' 82%) risultavano positivi per *Listeria Spp*; di questi solo 3 lotti (pari al 6%) risultavano positivi per *Listeria monocytogenes*.

Appare significativo il dato di isolamento in 38 lotti (pari al 76%) di altre specie di *Listeria spp.* così ripartite: (Grafico 2.)

*L. innocua* 56% dei lotti positivi

*L. grayi* 16% dei lotti positivi  
*L. welshimeri* 2% dei lotti positivi  
*L. ivanovii* 2% dei lotti positivi

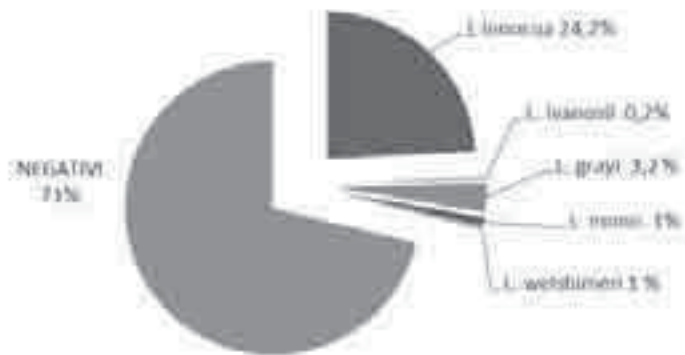


Grafico 1. Distribuzione della Listeria sul totale dei campioni analizzati (500 campioni)

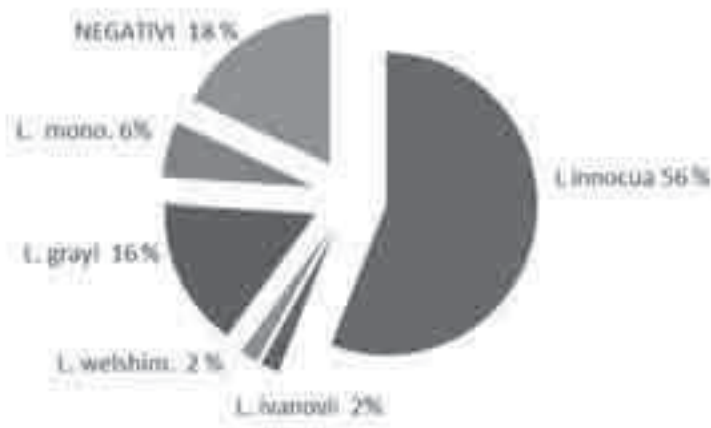


Grafico 2. Distribuzione della Listeria sul totale dei lotti analizzati (50 lotti)

#### Studio di antibioticoresistenza

Lo studio condotto sull'antibioticoresistenza tramite MIC consentiva di osservare una costanza di risultati per tutti i ceppi di *L. innocua*; dati sovrapponibili sono stati ottenuti anche per *L. welshimeri* e *L. monocytogenes*. In particolare tutti i ceppi mostravano completa sensibilità ai seguenti principi attivi: Amoxicillina, Doxiciclina, Tetraciclina, Neomicina, Colistina, Lincomicina/Spectinomomicina e Sulfamidico/trimethoprim. Tutti i ceppi risultavano resistenti a Tilosina, Tilmicosina e Tiamulina. Una maggiore variabilità nella sensibilità agli antibiotici si osservava per la molecola Oxacillina ( $\beta$ lattamico) nei confronti della quale 3 su 28 ceppi di *L. innocua* ed 1 su 3 di *L. monocytogenes* risultavano resistenti.



I dati di MIC ottenuti per *L. grayi* (8 ceppi) e *L. ivanovii* (1 ceppo) risultano estremamente variabili in termini di prestazioni, con caratteristiche di spiccata resistenza nei confronti della maggior parte dei principi attivi impiegati. In particolare due ceppi di *L. grayi* e l'unico ceppo di *L. ivanovii* risultavano resistenti a tutti i  $\beta$ lattamici e all'associazione sulfamidico/trimethoprim. Uno dei ceppi di *L. grayi* resistente ai  $\beta$ lattamici e la stessa *L. ivanovii* risultavano resistenti anche alla tetraciclina.

Tabella 1. Elenco antibiotici e range di distribuzione

MIC	
PRINCIPIO ATTIVO	RANGE ( $\mu\text{g/ml}$ )
Penicillina G	0.125-2
Amoxicillina	2-16
Enrofloxacin	0.25-2
Doxiciclina	2-8
Tilosina	0.5-2
Tetraciclina	2-8
Tilmicosina	8-16
Neomicina	8-16
Lincomicina/spectinomycin	8/32 (unica conc.)
Sulfamidico/trimethoprim	0.5/9.5-2/38
Oxacillina	0.25-2
Colistina	2-4
Eritromicina	0.25-4
Tiamulina	8-16
Lincomicina	1-4

Tabella 2. Distribuzione dei risultati *Listeria innocua*

LISTERIA INNOCUA			
N. totale di ceppi analizzati			
28			
	Numero di ceppi		
	R	I	S
Penicillina G	0	0	28
Amoxicillina	0	0	28
Enrofloxacin	0	0	28
Doxiciclina	0	0	28
Tilosina	28	0	0
Tetraciclina	0	0	28
Tilmicosina	28	0	0
Neomicina	0	0	28
Lincomicina/spectinomycin	0	0	28
Sulfamidico/trimethoprim	0	0	28
Oxacillina	3	0	25
Colistina	28	0	0
Eritromicina	0	0	28
Tiamulina	28	0	0
Lincomicina	2	2	24

Tabella 3. Distribuzione dei risultati *Listeria grayi*

<b>LISTERIA GRAYI</b>			
N. totale di ceppi analizzati			
8			
	Numero di ceppi		
	R	I	S
Penicillina G	1	2	5
Amoxicillina	0	0	8
Enrofloxacina	1	1	6
Doxiciclina	1	0	7
Tilosina	8	0	0
Tetraciclina	1	0	7
Tilmicosina	8	0	0
Neomicina	2	0	6
Lincomicina/spectinomina	1	0	7
Sulfamidico/trimethoprim	2	0	6
Oxacillina	2	0	6
Colistina	8	0	0
Eritromicina	1	0	7
Tiamulina	8	0	0
Lincomicina	1	0	7

Tabella 4. Distribuzione dei risultati *Listeria welshimeri*

<b>LISTERIA WELSHIMERI</b>			
N. totale di ceppi analizzati			
1			
	Numero di ceppi		
	R	I	S
Penicillina G	0	0	1
Amoxicillina	0	0	1
Enrofloxacina	0	0	1
Doxiciclina	0	0	1
Tilosina	1	0	0
Tetraciclina	0	0	1
Tilmicosina	1	0	0
Neomicina	0	0	1
Lincomicina/spectinomina	0	0	1
Sulfamidico/trimethoprim	0	0	1
Oxacillina	0	0	1
Colistina	1	0	0
Eritromicina	0	0	1
Tiamulina	1	0	0
Lincomicina	0	1	0

Tabella 5. Distribuzione dei risultati *Listeria ivanovii*

<b>LISTERIA IVANOVII</b>			
N. totale di ceppi analizzati			
1			
		Numero di ceppi	
	R	I	S
Penicillina G	1	0	0
Amoxicillina	0	1	0
Enrofloxacina	1	0	0
Doxiciclina	1	0	0
Tilosina	1	0	0
Tetraciclina	1	0	0
Tilmicosina	1	0	0
Neomicina	0	0	1
Lincomicina/spectinomicina	0	0	1
Sulfamidico/trimethoprim	1	0	0
Oxacillina	1	0	0
Colistina	1	0	0
Eritromicina	0	0	0
Tiamulina	0	0	0
Lincomicina	0	0	1

Tabella 6. Distribuzione dei risultati *Listeria monocytogenes*

<b>LISTERIA MONOCYTOGENES</b>			
N. totale di ceppi analizzati			
3			
		Numero di ceppi	
	R	I	S
Penicillina G	0	0	3
Amoxicillina	0	0	3
Enrofloxacina	0	0	3
Doxiciclina	0	0	3
Tilosina	3	0	0
Tetraciclina	0	0	3
Tilmicosina	3	0	0
Neomicina	0	0	3
Lincomicina/spectinomicina	0	0	3
Sulfamidico/trimethoprim	0	0	3
Oxacillina	1	0	2
Colistina	3	0	0
Eritromicina	0	0	3
Tiamulina	3	0	0
Lincomicina	0	0	3

### Conclusioni

Dallo studio, condotto su 500 carcasse prelevate casualmente provenienti da 50 partite (distribuite su 13 province del territorio nazionale), appare bassa la contaminazione da *Listeria monocytogenes* nelle feci di pollo al macello. La causa di contaminazione della matrice “carne” ed in particolare delle carni avicole oggetto dello studio va quindi sempre più ricercata negli ambienti di lavorazione degli alimenti che diventano *in primis* una fonte di contaminazione per gli stessi alimenti durante la loro lavorazione. Tale fenomeno è sicuramente enfatizzato dalla capacità intrinseca della *Listeria* spp. di crescere e sopravvivere durante i processi di lavorazione, stoccaggio e distribuzione.

Questo studio quindi, a differenza di quanto avviene per *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., sembra escludere le carni avicole e le feci di pollo come potenziali fonti di contaminazione diretta di *Listeria monocytogenes* della carcassa lungo la filiera produttiva.

Non appare altrettanto incoraggiante il dato relativo all'alta prevalenza di isolamento dalle feci di pollo di altre specie di *Listeria* (*L.innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi* e *L. welshimeri*) considerate non responsabili di malattia alimentare. L'affermazione deriva dal fatto che molti dati bibliografici dimostrano come batteri patogeni possano acquisire resistenza agli antibiotici da altri batteri saprofiti e commensali, privi di pericolosità diretta, ma possibili serbatoi di geni di resistenza agli antibiotici (12). Per questo motivo lo studio condotto per valutare il grado di sensibilità agli antibiotici, veniva esteso a tutti i ceppi di *Listeria* spp. La scelta del sistema standardizzato di MIC impiegato, era giustificata dal fatto che tra le 15 diverse concentrazioni di antibiotici, erano incluse quelle classi farmacologiche utilizzate come terapia d'elezione della listeriosi: antibiotici  $\beta$ lattamici (penicillina G o ampicillina) eventualmente associati, nei pazienti immunocompromessi, ad un aminoglicoside (come la gentamicina); nei pazienti allergici ai  $\beta$ lattamici, il trattamento di seconda scelta è costituito dall'associazione tra il trimethoprim ed un sulfonamide (quale ad esempio il sulfametossazolo) (9). Lo studio sull'antibioticoresistenza metteva in evidenza una significativa resistenza ai  $\beta$ lattamici in diversi ceppi di *Listeria* spp., dato non trascurabile in virtù del fatto che tale classe farmaceutica rappresenta la prima scelta terapeutica per la listeriosi in campo umano. Lo stesso può essere messo in evidenza per l'associazione sulfamidico/trimethoprim e per la tetraciclina, in particolare nei confronti di *L. grayi* e *L. ivanovii*. I dati ottenuti offrono quindi notevoli spunti riflessione e approfondimento in particolare su quei batteri considerati saprofiti, ubiquitari e banali contaminanti delle derrate alimentari, non direttamente patogeni per l'uomo ma che potrebbero veicolare con i propri geni caratteristiche di antibioticoresistenza a microrganismi patogeni.

## Riferimenti normativi

- Decreto legislativo del governo n.155 del 26 maggio 1997 – Attuazione delle direttive 93/43/3/CEE e 96/3/CEE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari.
- Regolamento CE n 178/2002 del parlamento europeo e del consiglio del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- Regolamento CE n. 2160/2003 del parlamento europeo e del consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della Salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti
- Regolamento CE n.852/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari.
- Regolamento CE n.853/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- Regolamento CE n.2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Decreto legislativo del governo n.193 del 6 novembre 2007 – Attuazione

della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli della sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore.

- Regolamento CE n.1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007, che modifica il regolamento CE n.2073/2005.

## **Bibliografia**

- 1) Andrews J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration; Journal Of Antimicrobial Chemotherapy 48, Suppl. S1, 5-16  
antibiotic resistance in *Listeria* species”. Journal of Infectious Diseases 172, 277-281
- 2) Clinical and Elaboratory Standard Institute (CLSI) 2006a. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved guideline (M45-A, Vol. 26 No. 19). CLSI, Wayne, PA.
- 3) Clinical and Elaboratory Standard Institute (CLSI) 2006b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement. (M100-S16, Vol 26 No 3). CLSI, Wayne, PA.
- 4) Charpentier E., Gerbaud G., Jacquet C., Rocourt J., Courvalin P. (1995). “Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. Journal of Infectious Diseases 172, 277-281
- 5) Gudbjornsdottir B., Suihko M.L., Gustavsson P., Thorkelsson G., Salo S., Sjoberg A-M., Niclasen O., Bredholt S.(2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. Food Microbiology, 21, 217-225.
- 6) ISO 11290-1:1996 “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: Detection method
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Waiane, PA
- 8) O.I.E. : “Manual of Standards for Diagnostic Tests And Vaccines” – fifth edition- 2004
- 9) Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal (2007) 599, 16-42
- 10) The American Association of Avian Pathologists: “A laboratory Manual For The Isolation and Identification of Avian Pathogens” – third edition- 1989
- 11) The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. Report of European Food Safety Authority (EFSA) 2008
- 12) Troxler R., Von Graevenitz A., Funke G., Wiedemann B., Stock I., 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species : *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 6, 525-535.

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell’ambito della ricerca IZSLER co-finanziata dal Ministero della Salute con i contributi del 5 per mille destinati all’attività di ricerca sanitaria***

## **STUDIO DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) IN CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ISOLATI NEL TRIENNIO 2010-2012**

Flaminio B., Gobbo F., Qualtieri K., Sturaro A., Battanolli G., Catania S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell'Università 10, 35020,  
Legnaro (PD), Italy; [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)*

### **Summary**

Mycoplasma are small prokaryotes lacking in cell wall. They are found in humans, animals, plants and insects. In particular, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) is considered an important pathogen for poultry industry: MG infection consists of a respiratory syndrome with airsacculitis, characterized by infraorbital sinusitis in turkey and reduced egg production in layers and breeders, causing severe economic losses. The control of mycoplasmosis is carried out by the maintenance of *Mycoplasma-free* animals and high levels of biosecurity, but if these measures are not sufficient, an antimicrobial therapy is required.

In order to obtain the therapeutic success and to avoid the onset of drug-resistance mechanisms, the practitioners should make use of the MIC (Minimum Inhibitory Concentration), that is the lowest concentration of an antibiotic able to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism in *in vitro* cultivation.

The aim of this study is to investigate the antimicrobial susceptibility of some MG strains isolated in the years 2010-2012 from different commercial categories (broiler breeder, hen layer, meat turkey and chicken breeder). MICs were performed using the microdilution method with commercial plates.

Our preliminary results show a good susceptibility for spectinomycin. Even if we noticed some resistant strains, the macrolides, especially the tylosin and the tetracycline could represent a good candidates for the therapy. Moreover the tested strains showed a resistance to fluoroquinolones, and lincomycin.

### **INTRODUZIONE**

I micoplasmami sono piccoli procarioti appartenenti alla classe dei *Mollicutes*, delimitati soltanto da membrana plasmatica, in quanto mancano di parete cellulare. Essi sono ampiamente diffusi nel mondo, e sono in grado di infettare una vasta gamma di ospiti, inclusi uomo, animali, piante ed insetti.

In particolare, *Mycoplasma gallisepticum* è considerato un patogeno molto importante nel settore avicolo, in grado di dar luogo a sintomatologia clinica di notevole entità, con conseguenti gravi perdite economiche. Esso è responsabile nel pollo e nel tacchino di una grave sindrome respiratoria caratterizzata nel tacchino da tumefazione dei seni infraorbitali e aerosacculite, e può anche provocare nei riproduttori calo dell'ovodeposizione e mortalità embrionale, essendo dunque causa di notevoli perdite economiche.

Appare dunque chiaro come il controllo di questo patogeno a livello industriale sia fondamentale: l'applicazione di alti livelli di biosicurezza in allevamento e il mantenimento di animali *Mycoplasma-free* possono in alcuni casi però non essere

misure sufficienti, e di conseguenza la terapia antibiotica rimane uno strumento importante in possesso del medico veterinario per contenere le infezioni. La scelta del chemioterapico più opportuno va compiuta in modo oculato, allo scopo sia di ottenere una buona risposta terapeutica che di evitare l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza.

A tal fine, per avere una stima della suscettibilità o della resistenza di un determinato microrganismo agli antimicrobici, si può utilizzare il calcolo della MIC (Minima Concentrazione Inibente), cioè la determinazione della più bassa concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita e/o il metabolismo di un microrganismo *in vitro*. In aggiunta, integrando i valori di MIC calcolati con i *breakpoints* di sensibilità (ossia le concentrazioni, espresse in µg/ml, definite da organizzazioni internazionali come soglia per esprimere la sensibilità o la resistenza dei microrganismi agli antibiotici), si può avere una valutazione dei dati *in vitro* sulla possibile sensibilità o resistenza del ceppo nei confronti della molecola testata.

In base a quanto esposto, è stato deciso di testare la suscettibilità alle principali molecole antibiotiche di alcuni ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* appartenenti a differenti categorie produttive di avicoli industriali isolati nel triennio 2010-2012.

## MATERIALI E METODI

13 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum*, provenienti da altrettanti focolai di malattia verificatisi nel triennio 2010-2012, sono stati isolati nel laboratorio di microbiologia diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Padova e stoccati nella nostra ceppoteca. 4 ceppi sono stati isolati da tacchini da carne, 3 da tacchini riproduttori, 4 da galline ovaiole e 2 da polli riproduttori.

I suddetti ceppi sono stati poi rivitalizzati in Experience Medium®, e sottoposti a tre clonaggi seriali, sia in fase liquida che in fase solida, al fine di ottenere delle colture clonali. Al terzo passaggio in terreno liquido si è proseguito con la produzione della brodocoltura per la MIC, inoculando 1 ml del terzo passaggio in 9 ml di terreno colturale per micoplasmi. Le colture ottenute, in fase logaritmica, sono state suddivise in sub-aliquote e stoccate a -80°C per almeno 24 ore. Un'aliquota, dopo scongelamento, è stata utilizzata per la titolazione della brodocoltura, utilizzando il metodo UCC (Unit Changing Colour). I ceppi titolati sono quindi stati inoculati in micropiastre Sensititre®, previa opportune diluizioni al fine di ottenere un inoculo con titolo standard di  $10^3$  -  $10^5$  UCC/ml. Le molecole testate comprendevano tilosina, tilmicosina, lincomicina, eritromicina, spectinomicina, ossitetraciclina, ed enrofloxacin.

Le piastre venivano controllate giornalmente per evidenziare l'avvenuta crescita nel pozzetto del controllo positivo: una volta riscontrata l'acidificazione di tale pozzetto, la MIC dei ceppi in esame, ossia il primo pozzetto in cui non si assiste a viraggio indice di crescita batterica, veniva riportata in un apposito foglio di lavoro.

I valori di MIC ottenuti per i ceppi in esame sono riportati nella tabella 1.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I ceppi sottoposti a prova hanno manifestato una evidente resistenza nei confronti della maggior parte di molecole testate dato facilmente evidenziabile attraverso la valutazione delle MIC 50 e MIC 90 del presente studio ad eccezione di alcune molecole quali la spectinomicina, la tilosina e l'ossitetraciclina. In particolare la

spectinomomicina è risultata essere la molecola più efficace manifestando l'attività inibente migliore testimoniata dal fatto che la MIC 50 è al di sotto del breakpoint di sensibilità, mentre la tilosina e la ossitetraciclina hanno manifestato una MIC 50 comparabili con i *breakpoints* di suscettibilità intermedia.

Una buona efficacia è stata riscontrata per la spectinomomicina, poiché 10 ceppi su 13 hanno manifestato valori di MIC inferiori ai *breakpoints* di sensibilità.

I ceppi testati hanno manifestato una discreta suscettibilità nei confronti dei macrolidi: in particolare 5 di essi, di cui 4 isolati da gallina ovaioia ed uno da tacchino, presentavano valori di MIC inferiori ai *breakpoints* di sensibilità verso la tilosina, inoltre due isolati da pollo riproduttore sono stati classificati come intermedi per la tilosina. La tilmicosina ha manifestato valori di suscettibilità nei soli 4 ceppi isolati da gallina ovaioia. Infine l'eritromicina, è risultata efficace in 3 ceppi mentre il 4° è stato classificato come intermedio. Sembra dunque che *Mycoplasma gallisepticum* stia acquisendo meccanismi di antibiotico-resistenza verso questa classe di antibiotici, anche se in misura minore verso la tilosina, la quale sembra possedere delle capacità specifiche intrinseche alla molecola che rendono più efficace la sua attività nei confronti dell'MG.

L'ossitetraciclina, ha mostrato attività nei confronti di due isolati, mentre 7 isolati sono stati classificati come intermedi, che risulta essere un dato interessante dato l'utilizzo storico di tale molecola.

*Mycoplasma gallisepticum* si è invece dimostrato resistente alla lincomomicina e all'enrofloxacin, con soltanto un ceppo risultato suscettibile verso quest'ultima.

Tali dati forniscono una valutazione iniziale sull'efficacia *in vitro* delle principali molecole antibiotiche nei confronti di *Mycoplasma gallisepticum*: essi necessitano però di ulteriori indagini aumentando il numero di isolati e dei principi attivi da testare.

Da questi risultati preliminari appare però evidente una situazione di criticità relativa al trattamento terapeutico nei confronti di MG dato che la maggior parte di molecole testate mostra l'inefficacia della molecola *in vitro*. Per tale motivo ulteriori studi di antibiotico suscettibilità sono consigliati al fine di indirizzare correttamente l'utilizzo dei farmaci evitando quindi di favorire fenomeni di iniziale o potenziale resistenza che sono già in atto nella popolazione di MG isolati negli anni precedenti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and laboratory standards institute (2011) Methods for Antimicrobial Susceptibility testing for human Mycoplasma; approved guideline. M-43 Vol. 31 No. 19.
2. Hannan Peter CT, A review article: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 2000, 31:373-395
3. Hannan, P.C., Windsor G.D., de Jong A., Schmeer N., Stegemann M. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. Sep;41 (9):2037-40



	<b>Til</b>	<b>Tilm</b>	<b>Linc</b>	<b>Eri</b>	<b>Spec</b>	<b>Ossi</b>	<b>Enro</b>
<b>Ceppo 1</b>	0,5	32	>32	>32	8	32	>32
<b>Ceppo 2</b>	2	32	32	32	2	2	32
<b>Ceppo 3</b>	2	32	32	32	2	8	32
<b>Ceppo 4</b>	<0,12	<0,12	8	<0,12	8	8	>32
<b>Ceppo 5</b>	8	>32	32	>32	>32	32	>32
<b>Ceppo 6</b>	8	>32	32	>32	>32	8	>32
<b>Ceppo 7</b>	<0,12	<0,12	8	<0,12	8	8	8
<b>Ceppo 8</b>	8	>32	>32	>32	>32	32	>32
<b>Ceppo 9</b>	8	>32	32	>32	8	8	>32
<b>Ceppo 10</b>	8	>32	32	>32	8	8	>32
<b>Ceppo 11</b>	<0,12	<0,12	8	2	8	8	>32
<b>Ceppo 12</b>	<0,12	<0,12	8	<0,12	8	2	0,5
<b>Ceppo13</b>	>32	>32	>32	>32	8	32	>32

**Tabella 1:** Valori di MIC ottenuti.

Til=Tilosina; Tilm=Tilmicosina; Linc=Lincomicina; Eri=Eritromicina;  
Spec=Spectinomomicina; Ossi=Ossitetramicina; Enro=Enrofloxacin.

Ceppo 1, 9, 10 e 13: MG isolati da tacchino da carne

Ceppi 2 e 3: MG isolati da pollo riproduttore

Ceppi 4, 7, 11 e 12: MG isolati da gallina ovaioia

Ceppi 5 e 6: MG isolati da tacchino riproduttore

	<b>Til</b>	<b>Tilm</b>	<b>Linc</b>	<b>Eri</b>	<b>Spec</b>	<b>Ossi</b>	<b>Enro</b>
MIC 50	2	32	32	32	8	8	32
MIC 90	8	32	32	32	32	32	32

**Tabella 2:** Valori di MIC50 e M)IC 90.

*Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 "Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole."*

**MYCOPLASMA SYNOVIAE E CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC): VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO SUSCETTIBILITÀ IN FUNZIONE DELLA CATEGORIA PRODUTTIVA E DEL GENOTIPO (VLHA).**

Gobbo F., Flaminio B., Fincato A., Baldasso E., Santone C., Catania S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)*

**ABSTRACT**

Minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial capable to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism *in vitro* cultivation. Mycoplasma are small prokaryotes without cell wall and their growth result "fastidious" making *in vitro* cultivation very difficult.

Mycoplasma species are important pathogens for poultry industry and particularly *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) can cause severe economic losses.

Recently the *Mycoplasma synoviae* has been correlated to economic losses in the layer sectors because of lesions of the apex of the eggshell(1, 2).

In Italy and in other European countries the incidence of MS seems to be increased and in spite of the implementation of biosecurity measures the recurrence of disease is frequently reported, demonstrating that these containment procedures are not always successful in prevention of spread of some Mycoplasma infections. For this reason the therapeutic approach is taking more and more importance and the minimum inhibitory concentration is the unique tool capable to give useful information on the antimicrobial susceptibility of the isolate involved in the outbreaks. Moreover MICs should be implemented in order to avoid the development of antibiotic resistance-mechanisms and to promote a more conscientious use of drugs as the European Commission has recently requested.

In order to differentiate between the circulating strains of *Mycoplasma synoviae* some biomolecular techniques can be applied like the investigation of the gene *vhA* encoding the VlhA hemagglutinin protein, also called MSP (Most Surface Protein) (3).

As different drug treatments are licensed for the different poultry commercial categories it is assume that strains belonged to different categories received a different selective pressure enhancing drug resistance mechanisms for specific antibiotics.

The aim of this study is to gain deeper knowledges of the antimicrobial susceptibility of 20 strains of MS, isolated in different commercial categories (broiler, layer, meat turkey and broiler breeder, turkey breeder and guinea fowl) in order to provide a useful tool for the poultry industry. Moreover we would like to discuss any possible preliminary correlation between the *vlhA*-pattern, commercial categories and MICs' results in order to establish if specific genotypes are more frequent in some categories and associated to specific antimicrobial profiles.

**INTRODUZIONE**

Le specie appartenenti al genere *Mycoplasma spp.* includono microrganismi considerati opportunisti e patogeni del Regno Animale e Vegetale e la loro coltivazione

*in vitro* risulta “fastidiosa”; sono organismi unicellulari privi di parete cellulare e tale caratteristica limita l’utilizzo di alcune famiglie antibiotiche nel trattamento delle micoplasmosi.

Nel settore avicolo industriale rivestono un ruolo particolarmente importante il *Mycoplasma gallisepticum* (MG), il *Mycoplasma synoviae* (MS) e recentemente nel settore del tacchino da carne il *Mycoplasma iowae* (4).

In particolare il *Mycoplasma synoviae* può causare, nel settore da carne, forme respiratorie ed articolari con conseguente incremento degli scarti al macello, mentre nel settore della gallina ovaiole è stato recentemente associato a lesioni apicali del guscio con importanti implicazioni economiche (1, 2). Inoltre la diffusione di questo patogeno sembra essere in aumento sia nel territorio nazionale che in quello comunitario (5, 6). Tale evidenza sottolinea che le misure applicate fino ad oggi, basate essenzialmente sulla gestione di gruppi di riproduttori *Mycoplasma-free*, sulla attuazione di rigide misure di biosicurezza e di profilassi indiretta, non siano più efficaci nella gestione del controllo di questo patogeno.

Sulla base di queste considerazioni l’approccio terapeutico rimane spesso l’unico mezzo per la gestione del focolaio, ma spesso non è accompagnato dall’isolamento del ceppo e da prove di farmaco-suscettibilità *in vitro*.

La concentrazione minima inibente MIC (Minimum Inhibitory Concentration) è la più bassa concentrazione di una sostanza antibiotica in grado di inibire la crescita visibile o il metabolismo di un microrganismo *in vitro* e tale metodo è considerato il “gold standard” tra tutti gli AST (Antimicrobial Susceptibility Tests) poiché fornisce indicazioni di natura quantitativa, consentendo al clinico una migliore gestione della scelta del farmaco e del regime terapeutico da applicare ad ogni singolo focolaio.

Inoltre, recentemente la Commissione Europea richiede una rivisitazione dell’utilizzo del farmaco a causa delle sempre più frequenti segnalazioni di farmaco-resistenza acquisita in seguito a pressione selettiva, soprattutto per antibiotici “criticamente importanti” per la salute umana (fluoroquinoloni, cefalosporine e macrolidi). La MIC è uno strumento capace di ottemperare a tali richieste promuovendo un più coscienzioso utilizzo del farmaco e permettendo il monitoraggio dello sviluppo di farmaco-resistenze.

Sfortunatamente pochi sono gli studi di natura epidemiologica sui micoplasmi di interesse veterinario, non consentendo di avere una panoramica dei ceppi circolanti in determinate micro-e macroaree e una correlazione tra forme cliniche (patotipi), antibiotico suscettibilità e categoria avicola di provenienza. Attualmente in letteratura il *Mycoplasma synoviae* è distinto in gruppi sulla base della sequenza nucleotidica di una specifica regione del gene *vlhA* che codifica per una PRR (Proline Rich Region) (3, 7) appartenente ad una proteina di superficie correlata alla cito-aderenza ed emoagglutinazione. Diversi fenotipi (emoagglutinazione +/-) si sono dimostrati in sede sperimentale responsabili di una diversa patogenicità nello sviluppo di lesioni articolari nel pollo (8). Ad oggi i genotipi riportati sono 6 (A, B, C, D, E, F), per il tipo C è stata fatta un’ulteriore suddivisione in sottotipi (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) in base all’identità di sequenza nucleotidica di un’altra regione del medesimo gene (RIII) (7). Sulla base di tali considerazioni ci siamo proposti di analizzare la MIC di 20 ceppi di campo di *Mycoplasma synoviae*, provenienti da differenti categorie produttive industriali e cercando una possibile correlazione tra genotipo (*vlhA*), categoria produttiva e suscettibilità antimicrobica.

## MATERIALI E METODI

I 20 ceppi di campo selezionati per il presente studio appartengono a diversi settori avicoli industriali: pollo riproduttore (7), broiler (2), gallina ovaiole (6), tacchino riproduttore (3), tacchino da carne (1) e faraona (1). Tali ceppi, disponibili presso la nostra ceppo teca, sono stati rivitalizzati in Experience Medium® (privo di sostanze inibenti) e quindi destinati alla produzione della brodo coltura, alla sua titolazione (UCC-Unit Change Colour) e al test della MIC secondo un metodo procedurato interno e seguendo le indicazioni disponibili in bibliografia con opportune modifiche (9, 10, 11).

I ceppi utilizzati per l'inoculo delle piastre MIC, sono stati diluiti fino a raggiungere un inoculo *standard* di 10<sup>4</sup> UCC/ml. Le micropiastre utilizzate per l'esecuzione del test (Sensititre®) ed il *panel* di antibiotici testati con le relative concentrazioni è riportato nella tabella 1.

In tabella 2 si riportano i valori di *breakpoints* utilizzati nel presente lavoro e disponibili in letteratura. Ogni ceppo è stato testato in replica e un ceppo di riferimento (*Mycoplasma synoviae* NCTC 10124) è stato testato in ogni sessione di prova. Le piastre una volta inoculate sono state incubate a + 37 ±1°C. Il controllo delle piastre è stato eseguito giornalmente al fine di evidenziare il viraggio del pozzetto denominato controllo positivo. Una volta evidenziato tale viraggio la lettura della piastra veniva eseguita annotando in una apposita scheda di lavoro l'ultimo pozzetto che ha manifestato viraggio indice di metabolismo batterico e quindi crescita e vitalità. Il valore di MIC corrisponde al primo pozzetto non mostrante viraggio, palesando l'attività di inibizione da parte dell'antimicrobico testato.

Per lo studio di genotipizzazione una aliquota della brodo coltura è stata destinata ad estrazione del DNA con kit commerciale (Sigma-Aldrich®), il DNA purificato è stato sottoposto a PCR come descritto da Hammond et al. (3) con opportune modifiche. I prodotti di PCR sono stati visualizzati con corsa elettroforetica in gel di acrilamide al 7% e successivamente inviati al sequenziamento. Le sequenze prodotte sono state allineate con il software MEGA® utilizzando come riferimento le sequenze elencate da Hammond *et al.* (2009).

L'allineamento è avvenuto in due fasi: classificazione del genotipo tramite allineamento del PRR (3) e successivamente per i genotipi C classificazione dei sottotipi per comparazione delle sequenze RIII rispetto a quelle postate da Bencina *et al.* (7).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del test sono disponibili nella Tabella 3, i valori di MIC sono associati alla categoria produttiva e al genotipo *vlhA*.

I ceppi testati risultano suscettibili alla tilosina, tilmicosina, spectinomina e lincomicina, e se pur in grado variabile alla ossitetraciclina; al contrario tutti i ceppi testati risultano resistenti alla eritromicina e alla enrofloxacin.

Seppur preliminari, e consci di dover incrementare il numero di ceppi per alcune categorie produttive, di seguito si riportano alcune considerazioni su valori MIC, genotipo *vlhA* e categoria avicola.

I ceppi utilizzati per tale studio sono stati classificati come D (55%), F (25%), H (15%) e C1 (5%), cercando di rispecchiare l'incidenza di isolamento riscontrata presso i nostri laboratori.

Tutti i ceppi con genotipo D ed F risultano suscettibili alla tilosina, tilmicosina spectinomicina e lincomicina, mentre l'ossitetraciclina mostra un leggero spostamento verso valori MIC leggermente più elevati.

Il genotipo H è stato isolato nel settore pollo riproduttore e gallina ovaiole con valori di MIC che evidenziano uno *shift* verso la resistenza antibiotica per tilosina, tilmicosina, ossitetraciclina e lincomicina.

Il genotipo C sottotipo C1, isolato da broiler, presenta marcata resistenza alla quasi totalità delle molecole testate. Ulteriori ceppi di tipo C1 dovrebbero essere testati per valutare tale caratteristica.

I valori di MIC riscontrati in ceppi provenienti da gruppi di riproduttori hanno manifestato una buona suscettibilità alle molecole testate ad eccezione dei fluorchinoloni, mentre dai ceppi di provenienza dal settore da carne e dalle galline ovaiole è possibile notare valori di MIC leggermente maggiori nelle molecole testate, manifestando in alcuni casi MIC superiori ai breakpoint di resistenza come nei casi del ceppo numero 2 e 17.

Da questo studio si evince che esistono ancora validi strumenti terapeutici nel trattamento terapeutico del *Mycoplasma synoviae*, inoltre risulta evidente in alcuni casi e per alcune molecole lo sviluppo, seppur precoce, di fenomeni di farmaco-resistenza.

La MIC può consentire un accurato monitoraggio di questi meccanismi e associata allo studio delle caratteristiche geniche degli isolati, fornire dati utili ad una più approfondita conoscenza della patogenesi e dell'epidemiologia delle micoplasmosi.

Tabella 1. Antibiotici testati con le relative concentrazioni ( $\mu\text{g/ml}$ )

	Tilosina	Tilmicosina	Lincomicina	Eritromicina	Spectinomicina	Ossitetraciclina	Enrorofloxacina
A	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
B	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
D	1	1	1	1	1	1	1
F	2	2	2	2	2	2	2
G	8	8	8	8	8	8	8
H	32	32	32	32	32	32	32

Tabella 2. Valori di *breakpoints* ( $\mu\text{g/ml}$ ) per le molecole antibiotiche testate

	S	I	R
Tilosina	$\leq 1$	$\leq 2$	$\geq 4$
Tilmicosina	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Lincomicina	*	*	$\geq 4$
Eritromicina	$\leq 0,5$	*	$\geq 8$
Spectinomicina	32	64	128
Ossitetraciclina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Enrofloxacina	$\leq 0,5$	$\leq 1$	$\geq 2$

Legenda: \* non presente, S sensibile, I intermedio, R resistente

Tabella 3. valori di MIC dei 20 ceppi di MS associati alla categoria produttiva e al genotipo *vlhA*.

Ceppo	VlhA Type	Categoria	Til	Tilm	Linc	Eri	Spec	Ossi	Enro
1	F	B	<0,12	0,50	2,00	>32	8,00	8,00	8,00
2	C1	B	8,00	>32,00	>32,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
3	D	BB	<0,12	0,50	1,00	>32	2,00	2,00	>32
4	F	BB	0,50	8,00	2,00	>32	2,00	2,00	>32
5	D	BB	<0,12	0,50	0,50	>32	0,50	0,50	>32
6	D	BB	<0,12	0,25	0,50	>32,00	2,00	8,00	>32,00
7	D	BB	<0,12	0,50	2,00	>32,00	2,00	2,00	>32,00
8	H	BB	0,25	2,00	1,00	>32,00	2,00	8,00	>32,00
9	H	BB	0,50	2,00	1,00	>32,00	8,00	1,00	>32,00
10	D	GF	0,50	8,00	1,00	>32	2,00	1,00	>32
11	F	L	<0,12	0,25	1,00	>32	8,00	2,00	>32
12	D	L	<0,12	0,25	0,50	>32	1,00	0,50	32,00
13	F	L	<0,12	0,25	0,50	>32	2,00	2,00	>32
14	D	L	<0,12	0,50	2,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
15	D	L	<0,12	0,50	0,50	>32,00	2,00	8,00	>32,00
16	H	L	<0,12	8,00	8,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
17	F	MT	<0,12	0,25	2,00	>32	2,00	2,00	>32
18	D	TB	<0,12	<0,12	1,00	>32	2,00	2,00	32,00
19	D	TB	<0,12	0,25	2,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
20	D	TB	<0,12	<0,12	0,50	>32,00	1,00	2,00	>32,00

Legenda: Til: Tilosina; Tilm: Tilmicosina; Lin: Lincomicina; Eri. Eritromicina; Spec: Spectinomina; Ossi: Ossitetraciclina; Enro: Enrofloxacin. B: Broiler; BB, Broiler Breeders; GF: Gallina Faraona; L: Gallina Ovaioia; MT: Tacchino da carne; TB; Tacchino Riproduttore

## BIBLIOGRAFIA

1. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 2010 Jun;54(2):961-4.
2. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009 38(1):77-85.
3. Hammond PP, Ramírez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet Microbiol.* 2009 Apr 14;136(1-2):61-8
4. S. Catania, F. Gobbo, D. Bilato, A. Fincato, G. Battannolli, L. Iob. Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. *Letters in Veterinary Record*, 28 Gennaio 2012. Pag. 107-108. doi: 10.1136/vr.e645.

5. S. Catania. Micoplasmata e micoplasmosi nel settore avicolo. Relazione ad invito al L Convegno Annuale SIPA, 7-8 Aprile 2011, Pag63-65.
6. A. Feberwee and W. J. M. Landman. Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae Control and Eradication in dutch Commercial Poultry. 19th International Congress of the IOM, 15-20 July 2012 Tolouse, France. Pag. 33
7. D. Bencina, M. Drobnic-Valic, S. Horvat, M. Narat, S.H. Kleven and P. Dovc. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of Mycoplasma synoviae hemagglutinin. FEMS Microbiol Lett., (2001) 203(1):115-23
8. M. Narat, D. Bencina, S. H. Kleven and F. Habe Hemagglutination-positive phenotype of Mycoplasma synoviae induces experimental infectious synovitis in chickens with a higher frequency than the haemoagglutination-negative phenotype. Infect. Immun(1998). 66, 6004-6009.
9. Hannan P.C.T. (2000) Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 31:373-395.
10. Clinical and laboratory standards institute (2011) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; approved guideline. M-43 Vol. 31 No. 19.
11. Blodgett R. (2010) FDA's Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions.
12. ([www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm)).

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole.***

## CONFRONTO TRA DIVERSE TIPOLOGIE DI ALLEVAMENTO DELLA GALLINA OVAIOLA COMMERCIALE

Guarneri P., Zuccarello S., Gallazzi D., Grilli G.

*Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano*

**Summary** Traditional or enriched cages for layers Vs slat floor

**Key words:** layers, cage systems, slat floor

In 15 layers farms, 10 with traditional cages ( total hens= n. 690,737), 4 with enriched cages (hens= n. 688,929), and 1 with slat floor (hens=n. 14,498), egg production, FCR, and mortality were compared during a whole cycle (54 – 56 weeks). Hybrid line, origin of pullets, and hygienic situation were the same in all the farms. On the average, in layers kept in cages the number of eggs was higher in the enriched cages (320.84 Vs 314.16 respectively), FCR was the same (2.024 Vs 2.046), while the mortality rate was higher in traditional cages (7.49 Vs 5). In a single farm whit the layers kept on slat floor the performance were worse than the cages, but the mortality rate was good (5%).

### INTRODUZIONE

L'adozione di sistemi alternativi di allevamento della gallina ovaioia voluta dalla UE ha generato perplessità, quando non disapprovazione, da parte di alcuni addetti del settore, che temevano un decadimento generale della produzione. Con questa ricerca, da ritenersi ancora preliminare, ci siamo prefissi di analizzare le diverse tipologie di allevamento oggi presenti in Italia, per un confronto delle prestazioni zoo-sanitarie fornite dalle galline e più precisamente: numero e peso delle uova prodotte, consumo di mangime, mortalità.

Mediante sopralluoghi diretti presso le aziende oggetto di studio sono stati effettuati anche controlli sui sistemi di gestione relativi alla stabulazione, comprendenti in modo particolare: il numero degli animali allevati, il numero di capannoni, il tipo di illuminazione e il sistema di ventilazione.

### Sistemi di allevamento

A partire dagli anni '80 in Europa occidentale e settentrionale sono sorti movimenti di opinione che hanno messo sotto accusa il sistema di allevamento in gabbia in quanto considerato un sistema di sfruttamento dell'animale costretto a vivere in cattività forzata e in condizioni innaturali. Questi movimenti hanno pertanto stimolato la ricerca scientifica ad occuparsi di etologia e di benessere animale, coinvolgendo anche gli organi di governo dell'Unione Europea.

Nel 1988 è stata approvata dalla CEE la Direttiva 88/166 relativa alla protezione delle ovaiole in batteria che definiva i requisiti che le gabbie dovevano soddisfare, fatto salvo il principio che ogni animale deve beneficiare di un ricovero, di una alimentazione e di cure appropriate ai suoi bisogni fisiologici ed etologici. Tale direttiva è stata abolita con l'entrata in vigore della Direttiva UE 1999/74 che, per la produzione dell'uovo da consumo, prevedeva tre diversi sistemi di allevamento:



- allevamento in gabbie convenzionali (non modificate);
- allevamento in gabbie arricchite o modificate
- allevamento in sistemi alternativi alla gabbia.

Inoltre, col Regolamento CE 1804/99, recepito in Italia con i DDMM 4 agosto 2000 e 29 marzo 2001, si regolamentava l'allevamento della gallina con il metodo biologico. In base a queste leggi, i sistemi di allevamento consentiti per le galline venivano in parte a corrispondere ai metodi di allevamento riportati con codici numerici sull'etichetta delle uova da consumo, secondo i DDLL 19/6/2002 e 29/7/2003, come sotto riportato.

0= allevamento biologico;

1= allevamento all'aperto;

2= allevamento a terra;

3= allevamento in gabbia.

### **Normativa di riferimento**

Negli allevamenti di ovaiole commerciali, l'allevamento in gabbia è stato preferito in quanto consente un migliore controllo dei problemi igienico-sanitari ed anche procedure tecnico operative più semplici.

Questo metodo di allevamento però non offre un'adeguata esplicazione del repertorio comportamentale della specie (muoversi liberamente, razzolare, agitare le ali, fare i bagni di sabbia), pertanto lo sviluppo del settore si è evoluto verso l'individuazione di sistemi alternativi di allevamento che però hanno rivelato altri tipi di problemi (cannibalismo, plumofagia), sollecitando perciò ulteriori studi sull'allevamento a terra per individuare gli effettivi vantaggi.

Gli indicatori di benessere sono parametri utili a definire l'appagamento delle esigenze psicofisiche dell'animale a fronte di un suo di un eventuale disagio, in rapporto alle condizioni in cui è mantenuto. La normativa, però, non individua né definisce indicatori di benessere per le galline ovaiole.

La normativa sul benessere delle galline ovaiole si integra con le disposizioni contenute in discipline concernenti il benessere degli animali allevati nei suoi aspetti generali. Per quanto riguarda la norma generale ricordiamo la Dir. Cons. 98/58/CE, protezione degli animali negli allevamenti e il D.Lgs n. 146/2001, Protezione degli animali negli allevamenti (recepimento Dir.98/58/Ce).

Per la norma specifica, ricordiamo:

- D.Lgs. n. 267/2003 (attuazione Dir. 1999/74/CE e 2002/4/CE) per la protezione delle galline ovaiole e dei relativi stabilimenti di allevamento
- Dir. Cons. 1999/74/CE, norme minime per la protezione delle galline ovaiole.
- Dir. Comm. 2002/4/CE, registrazione degli stabilimenti di allevamento di galline ovaiole
- Decreto 20 aprile 2006 del Ministero della Salute, modifica agli allegati al decreto legislativo 29 luglio 2003, n. 267, in attuazione delle direttive 1999/74/CE e 2002/4/CE, per la protezione delle galline ovaiole e la registrazione dei relativi stabilimenti di allevamento.

Al sistema di allevamento in gabbia sono state rivolte critiche concernenti principalmente l'impossibilità, per gli animali, di esprimere un etogramma naturale, che hanno

influenzato l'orientamento verso l'allevamento al suolo.

Anche l'allevamento a terra ha presentato i propri limiti come: cannibalismo, maggiore rischio di parassitosi, necessità maggiore di controllo farmacologico, aumento della polverosità e del livello di NH<sub>3</sub>.

Per quanto innaturale, l'allevamento in batteria rappresenta, in realtà, una graduale evoluzione della pratica zootecnica, iniziata a partire dagli anni '60-'70 e che ha portato alla sostituzione del sistema a terra.

Le motivazioni sono da ricercare in fattori quali: migliori garanzie igienico sanitarie ovvero maggior tutela del consumatore e ridotti problemi gerarchici per gli animali.

Ciononostante, come rilevato anche da Fossati (2008), la più recente inclinazione del legislatore è quella di dare nuovo impulso a sistemi di allevamento alternativi alla gabbia tradizionale, in risposta alle crescenti e sempre più ampiamente condivise esigenze di tutela degli animali quali esseri senzienti, dotati di una propria autonomia esistenziale, che non si esaurisce nel loro essere funzionali ai bisogni dell'uomo.

La prima norma specifica intervenuta a stabilire i parametri per la protezione e il benessere delle galline ovaiole in batteria è stato il DPR 24/05/1988, n. 233, di attuazione della Direttiva CEE 86/113, che fissava i requisiti minimi per le gabbie costruite o installate nell'allevamento delle galline ovaiole. Tra i suddetti requisiti minimi, era previsto che le galline ovaiole disponessero di almeno 450 cm<sup>2</sup> di superficie di gabbia utilizzabile senza restrizioni e misurata su un piano orizzontale. Successivamente, a seguito dell'annullamento della Direttiva n. 86/113 da parte della Corte di Giustizia europea, il legislatore comunitario è intervenuto con un'ulteriore Direttiva, la n.74 del 19 luglio 1999.

In Italia la Direttiva 1999/74/CE è stata recepita unitamente alla successiva Direttiva 2002/4/CE con il Decreto Legislativo 29 luglio 2003, n. 267. In esso sono stati definiti i nuovi requisiti minimi per la protezione delle galline ovaiole ricalcolando la densità di spazio vivibile per ogni gallina; i nuovi sistemi alternativi di allevamento e l'obbligo della registrazione dei relativi stabilimenti che allevano tali animali. Le prescrizioni per i sistemi di allevamento previste dalla norma definiscono, in buona sostanza, il futuro della zootecnia applicata alle galline ovaiole, nel quale non avranno più posto le vecchie soluzioni "in batteria".

Con l'entrata in vigore del Decreto Legislativo n. 267/2003, gli obblighi del proprietario e del detentore degli animali, così come l'obbligo di preparazione professionale degli operatori professionali, sono rinviati alle disposizioni contenute nell'allegato A alla norma medesima, in aggiunta a quelle già precedentemente indicate nel D.Lgs n.146/2001 relativo al benessere in allevamento degli animali da reddito. Il decreto individua tre tipi di sistema di allevamento, distinguendo in:

- Allevamento in gabbie non modificate,
- Allevamento in gabbie modificate
- Allevamento con sistemi alternativi.

Gabbia non modificata (*D.Lgs. n.627/03, allegato C*)

Permane il riferimento all'allevamento in gabbie tradizionali, destinate, però a essere completamente sostituite. Peraltro, tutte le gabbie devono soddisfare il requisito di

almeno 550 cm<sup>2</sup> di superficie di gabbia per ogni gallina ovaioia, misurato su un piano orizzontale e utilizzabile senza limitazioni; dal calcolo vanno esclusi eventuali bordi deflettori antispreco.

Queste disposizioni, come sottolineato anche da Fossati (2008), portano da un lato all'aumento dello spazio disponibile che è concesso agli animali, dall'altro però originano un notevole impatto sui sistemi di allevamento tradizionale, con diminuzione del numero di capi allevabili a parità di impianto. Le gabbie devono essere dotate di pavimento che sostenga adeguatamente ciascuna delle unghie anteriori di ciascuna zampa. La pendenza del pavimento non deve superare il 14% , pendenze superiori sono consentite solo per i pavimenti diversi da quelli provvisti di rete metallica rettangolare. E' prevista , inoltre, la presenza di dispositivi per accorciare le unghie. Le prescrizioni sulle gabbie non modificate valgono per l'adeguamento delle strutture già esistenti. Infatti, dalla sua entrata in vigore la norma vieta che ne siano costruite e attivate secondo la concezione tradizionale. Da gennaio 2012 questo divieto è stato definitivo per tutti gli allevamenti e il vecchio sistema è scomparso.

#### Gabbia modificata (*D.Lgs. n.627/03, allegato D*)

In considerazione degli aspetti positivi comunque riconosciuti ai sistemi di allevamento in gabbia, la norma si propone di ottimizzarne la funzionalità proponendo gabbie migliorate e dotate di complementi ritenuti necessari per favorire il benessere degli animali, obbligatori dal 2013. Tali strutture devono consentire alle galline ovaiole di disporre 750 cm<sup>2</sup> per ogni soggetto, di cui 600cm<sup>2</sup> utilizzabili e la superficie totale di ogni gabbia non può essere inferiore a 2000 cm<sup>2</sup>. In rapporto allo spazio disponibile, queste misure consentono di ottenere un incremento a vantaggio degli animali, che si traduce però in una riduzione della entità nel numero di capi allevabili a parità di impianto. Oltre alle nuove superfici, le gabbie degli allevamenti nuovi o ristrutturati devono disporre di un nido, la cui area non entra a far parte della superficie utilizzabile; di una lettiera che consenta di becchettare e razzolare; di posatoi appropriati che offrano almeno 15 cm di spazio per gallina.

#### Sistemi alternativi

Tra i sistemi alternativi, l'allevamento su lettiera profonda prevede che le galline siano allevate a terra in capannoni che permettono il controllo delle condizioni ambientali, con il pavimento ricoperto almeno per un terzo da lettiera costituita da paglia, trucioli di legno, sabbia o torba. La rimanente parte della lettiera deve essere costituita da grigliato, per allontanare le deiezioni, sul quale vengono poste le mangiatoie e gli abbeveratoi. Le uova vengono deposte in nidi individuali (1 ogni 4 animali) e la raccolta avviene meccanicamente, tramite nastro trasportatore. Questo sistema assicura buone prestazioni e il consumo di alimenti si discosta di poco da quello delle ovaiole allevate in gabbia. Si hanno però casi di deposizioni di uova fuori dal nido, quindi un prodotto meno pulito, con difficoltà di raccolta e aumento dei tempi di lavoro.

A partire dal sistema a lettiera permanente, si sono sviluppati gli aviari, che sono concepiti in modo da sfruttare meglio l'altezza e, quindi, l'intero volume dell'edificio di allevamento. Sono infatti previste gabbie a più piani, con diversi tipi di

pavimentazione, ai quali le ovaiole accedono tramite i posatoi. Fra i vantaggi offerti da questa tipologia d'allevamento c'è il maggior spazio disponibile per il movimento, che favorisce una maggior robustezza delle ossa. Gli aviari sono disponibili in numerose varianti.

Un altro sistema è il cosiddetto *free-range*, che consiste nel far razzolare le ovaiole su terreno aperto, con una densità massima di 1.000 animali ad ettaro. In questo tipo di allevamento è prevista la presenza di ricoveri notturni simili a quelli descritti per il sistema a lettiera. I vantaggi principali di questo sistema sono la grande libertà di movimento e la bassa densità d'allevamento. Il consumo di alimenti è variabile in funzione della stagione. Gli aspetti negativi, sono principalmente legati alla più facile propagazione delle malattie parassitarie e alla produttività non costante, a causa dello scarso controllo sulle condizioni ambientali.

### **Materiali e metodi**

La ricerca si è svolta in 15 allevamenti di galline ovaiole, situati in Lombardia; di cui 10 adottano le gabbie tradizionali, 4 le gabbie arricchite e 1 solo allevamento a terra. Ad esclusione di quest'ultimo sistema, ancora poco diffuso, negli altri casi, per poter fare un confronto reale, si è cercato di mantenere omogeneo non il numero degli allevamenti, ma il numero totale delle galline ovaiole allevate per tipologia.

Tutti i soggetti appartenevano alla stessa linea genetica ed erano stati forniti tutti dalla stessa azienda produttrice di pollastre; così come il mangime somministrato aveva le stesse caratteristiche in tutti gli allevamenti presi in considerazione. Lo standard igienico-sanitario risultava generalmente di buon livello e, nel periodo considerato, non si è presentato alcun particolare problema sanitario .

Nella maggior parte dei casi, come si evince dalla tabella I, considerando tutte le tipologie di allevamento, le strutture esaminate presentavano una ventilazione longitudinale che, soprattutto nel periodo estivo, migliora il riciclo dell'aria. E' noto infatti come la ventilazione trasversale favorisca maggiormente le infezioni da *Escherichia coli*, a causa delle sacche d'aria mal ricambiata che si vengono a creare.

Nel caso dell'allevamento a terra invece la ventilazione è risultata essere naturale, perché l'allevatore ha preferito montare solo delle finestre laterali che si aprono e chiudono automaticamente in funzione della temperatura esterna.

E' ovvio che, essendo le galline ovaiole animali fotosensibili, anche l'impianto di illuminazione è di fondamentale importanza perché da esso, così come noto da anni e riportato in tutti i testi di avicoltura (uno per tutti Ensminger, 1992), è strettamente influenzata la produzione di uova e la crescita corporea.

Negli allevamenti sia in gabbia tradizionale che in gabbia arricchita le lampade per illuminare in modo uniforme le varie aree erano montate lungo i corridoi di servizio e ad altezze diverse per illuminare omogeneamente tutti i piani; inoltre i programmi di luce adottati prevedevano 20-30 lux dal momento dall'accasamento al picco di produzione (da 25<sup>a</sup>-26<sup>a</sup> a 30<sup>a</sup>-32<sup>a</sup> settimana); poi l'intensità della luce veniva programmata a circa 10-15 lux, per poter ispezionare adeguatamente le strutture e gli animali.

Per una corretta valutazione e analisi dei dati si è tenuto conto pure di: parametri strutturali, data di costruzione, numero di capannoni, numero di piani, sistema di

ventilazione e tipo di illuminazione.

Per quanto riguarda la valutazione delle produzioni, i dati raccolti hanno riguardato un intero ciclo di produzione.

I parametri valutati sono stati:

- % mortalità, ovvero il numero di animali morti dalla data di accasamento fino alla fine del ciclo produttivo, calcolato percentualmente sul numero di animali accasati.
- Età di entrata, ovvero l'età media (in giorni) in cui gli animali vengono trasferiti dall'allevamento di pollastra a quello di deposizione.
- Età alla macellazione(calcolata in settimane).
- Consumo di mangime, calcolato in g/capo/giorno, dal giorno di entrata nell'allevamento di deposizione alla macellazione.
- Numero di uova prodotte per ogni gallina accasata
- kg di uova prodotte per ogni gallina accasata
- Il peso medio (p.m.) uova, che corrisponde al rapporto tra il peso totale delle uova prodotte rispetto al numero totale uova prodotte. Questo parametro è influenzato dalla linea genetica, dal contenuto in acido linoleico, dal tenore proteico ed amminoacidico del mangime, dall'età alla stimolazione luminosa (se stimolate giovani le galline produrranno uova piccole e viceversa);
- Indice di conversione per numero di uova, che corrisponde al rapporto tra i grammi di mangime consumati da ogni singola gallina durante tutto il ciclo partendo da 130 gg fino alla fine e il numero di uova prodotte per ogni singola gallina;
- Indice di conversione, che corrisponde al rapporto tra i kg di mangime consumati da ogni singola gallina durante tutto il ciclo partendo da 130 gg fino alla fine, rispetto ai kg di uova prodotte per ogni singola gallina. L'indice di conversione rappresenta il più importante dato tecnico di un qualsiasi allevamento, in quanto il mangime è la voce di costo maggiore (60% circa). Tale indice è influenzato soprattutto dalle caratteristiche del mangime, ma anche dalla linea genetica, dalla temperatura d'allevamento, dal metodo d'allevamento e dalle capacità gestionali.

Nella tabella I sono raccolti i dati dei diversi allevamenti considerati: numero dei soggetti allevati, numero di capannoni, numero di piani delle gabbie, tipo di stabilizzazione, anno di costruzione, sistemi di illuminazione e di ventilazione.

Allevamento	Numero capi	Numero capannoni	Numero piani	Sistema illuminazione	Sistema ventilazione	Anno di costruzione	Tipo di Stabulazione
1	122.073	1	10	Incandescenza	Longitudinale	2003	Gabbie tradizionali
2	22.485	1	5	Incandescenza	Longitudinale	1990	Gabbie tradizionali
3	82.366	2	5 ; 5	Incandescenza	Longitudinale	1992	Gabbie tradizionali
4	48.258	2	4 ; 4	Incandescenza	Trasversale	1989	Gabbie tradizionali
5	97.800	2	5 ; 5	Incandescenza	Longitudinale	1994	Gabbie tradizionali
6	30.785	1	4	Neon	Longitudinale	1995	Gabbie tradizionali
7	72.846	1	6	Incandescenza	Longitudinale	2002	Gabbie tradizionali
8	55.719	2	4 ; 4	Incandescenza	Trasversale	1989	Gabbie tradizionali
9	88.881	2	5 ; 5	Incandescenza	Longitudinale	1994	Gabbie tradizionali
10	69.524	2	5 ; 5	Neon	Trasversale	1992	Gabbie tradizionali
11	95.800	2	5 ; 5	Incandescenza	Trasversale	2009	Gabbie arricchite
12	183.914	1	10	Incandescenza	Longitudinale	2004	Gabbie arricchite
13	225.069	3	6 ; 6 ; 10	Incandescenza	Longitudinale	1999	Gabbie arricchite
14	184.146	1	6	Incandescenza	Longitudinale	2002	Gabbie arricchite
15	14.493	2	Terra	Neon	Naturale	2001	A terra

**Tab. I-**Caratteristiche costruttive degli allevamenti considerati

#### **Allevamenti con gabbie tradizionali.**

Quattro dei dieci allevamenti considerati, compreso quello col maggior numero di animali, dispongono di un unico capannone, con gabbie distribuite su dieci piani; gli altri sei allevamenti invece dispongono di due capannoni, generalmente con gabbie a quattro o cinque piani.

L'illuminazione adottata nei vari allevamenti è risultata essere, in otto casi su dieci, ad incandescenza, mentre negli altri due casi gli allevatori hanno preferito un'illuminazione a neon.

Sette allevamenti su tre avevano ventilazione longitudinale; gli altri tre ventilazione trasversale.

#### **Allevamenti con gabbie arricchite.**

Due allevamenti disponevano di un unico capannone con, rispettivamente, gabbie a sei piani e a dieci piani; un allevamento era suddiviso in due capannoni con ognuno cinque piani di gabbie; l'ultimo allevamento invece era collocato in tre capannoni, di cui due con sei piani di gabbie e uno con dieci piani.

L'illuminazione adottata è risultata essere in tre casi ad incandescenza, un solo allevamento ha presentato l'illuminazione a neon.

La ventilazione usata era prevalentemente longitudinale, un solo allevamento utilizzava la ventilazione trasversale.

### Allevamento a terra.

L'allevamento era diviso in due capannoni, entrambi illuminati a neon, con ventilazione di tipo naturale.

## RISULTATI

Gabbie tradizionali (Tab. II).

Lo studio ha riguardato un totale di 690.737 galline allevate in gabbie tradizionali, con età media iniziale di 16,53 settimane (115,74 gg) e macellate in media a 72,97 settimane; la mortalità media è stata pari al 7,49%.

Il consumo medio di mangime giornaliero, dal primo giorno di accasamento al giorno di macellazione, è risultato essere di 109,26 g. Le uova in media prodotte pro capite in tutto il ciclo di deposizione sono state 314,16, con un peso medio di 62,25 g, per un totale di 19,69 kg di uova prodotte/capo.

In relazione al mangime consumato in media da ogni singola gallina durante tutto il ciclo, rispetto al numero di uova prodotte, è risultato un indice di conversione pari a 126,55 g/uovo. L'indice di conversione (kg/kg, ovvero il rapporto tra i kg di mangime consumato da ogni singola gallina partendo da 130 gg di età fino alla fine del ciclo rispetto ai kg di uova prodotte per ogni singola gallina) è risultato pari a 2,024.

Allev. n.	Numero capi	Età entrata (gg)	Età macell. (settim.)	% mort.	Cons. inizio (g)	N° uova	p.m. uova (g)	kg prod.	I.C. uova	I.C. kg/kg
1	122.073	117,95	74,12	5,6	106,13	329,96	61,23	20,206	120,14	1,962
2	22.485	116,47	72,5	12,38	111,40	291,92	62,95	18,38	131,59	2,141
3	82.366	120,55	73,09	13,12	109,92	295,54	59,52	18,65	132,07	2,093
4	48.258	113,99	72,34	10,92	111,1	303,89	60,84	18,489	129,58	2,130
5	97.800	113,08	74,03	4,84	108,66	322,64	62,84	20,275	127,17	2,022
6	30.785	114,42	74,61	9,85	110,42	305,47	62,84	19,196	134,48	2,140
7	72.846	112,98	71,68	7,37	104,59	310,84	61,92	19,27	120,33	1,941
8	55.719	114,97	72,56	7,78	113,96	305,56	66,83	20,42	131,54	2,014
9	88.881	117,22	72,81	6,09	113,89	323,25	63,00	20,37	128,67	2,042
10	69.524	113,11	71,09	4,51	107,51	313,50	62,7	19,66	122,93	1,960
Totale/ media	<b>690.737</b>	<b>115,74</b>	<b>72,97</b>	<b>7,49</b>	<b>109,26</b>	<b>314,16</b>	<b>62,25</b>	<b>19,69</b>	<b>126,55</b>	<b>2,024</b>

**Tab. II** - Risultati ottenuti negli allevamenti con gabbie tradizionali

Gabbie arricchite (Tab. III).

In questo caso, il numero totale delle galline allevate in gabbia arricchita e oggetto di studio è stato di 688.929. Mediamente gli animali sono stati accasati a 16,55 settimane (115,86 gg) e macellati a 73,39 settimane, con un tasso di mortalità pari al 5%. Questi animali hanno avuto un consumo di mangime pari a 108,58 g/giorno; le uova

in media prodotte in tutto il ciclo di deposizione sono state 320,84/capo, con un peso medio di 61,76 g, per un totale di 19,81 kg di uova prodotte/gallina. L'indice di conversione è stato pari a 126,31g mangime/uovo. Nel caso invece dell'indice di conversione kg/kg, il valore risulta pari a 2,046.

**Tab. III** - Risultati ottenuti negli allevamenti con gabbie arricchite

Allev. n.	Numero capi	Età entrata (gg)	Età macell. (sett.)	% mort.	Cons. inizio (g)	N° uova	p.m. uova (g)	kg prod.	I.C. uova	I.C. kg/kg
1	95.800	113,58	74,50	4,70	106,53	342,50	60,12	20,59	118,65	1,974
2	183.914	114,11	74,23	5,09	109,35	323,94	62,91	20,38	127,83	2,032
3	225.069	117,76	73,03	4,93	108,95	319,45	62,78	20,05	126,34	2,013
4	184.146	116,46	72,43	5,15	108,44	308,16	60,22	18,56	128,73	2,138
Totale /media	<b>688.929</b>	<b>115,86</b>	<b>73,39</b>	<b>5,00</b>	<b>108,58</b>	<b>320,84</b>	<b>61,76</b>	<b>19,81</b>	<b>126,31</b>	<b>2,046</b>

**Tab. IV** - Risultati ottenuti nell'allevamento a terra

Allev. n.	Numero capi	Età entrata (gg)	Età macell. (settim.)	% mort.	Cons. inizio (g)	N° uova	p.m. uova (g)	kg prod.	I.C. uova	I.C. kg/kg
1	14.493	112,5	71,29	4,7	110,62	312,01	60,23	18,79	127,4	2,115

Nell'unico allevamento a terra studiato, gli animali allevati sono risultati 14.493, con età media di accasamento pari a 16,07 settimane (112,5 gg) e sono stati macellati a 71,29 settimane; la mortalità totale è stata del 4,7%. Il mangime consumato da ogni singola gallina per tutto il ciclo, in media, è stato di 110,62 g, con una produzione di 312,01 uova/gallina (peso medio di 60,23 g/uovo), per un totale di 18,79 kg di uova prodotte per capo. In questo allevamento l'indice di conversione sul numero di uova è stato pari a 127,4, mentre l'indice di conversione kg/kg è risultato essere di 2,115.

## DISCUSSIONE

Sulla base dei risultati ottenuti dalla presente ricerca si possono avanzare alcune considerazioni sulla gestione delle diverse tipologie di allevamento delle galline ovaiole. Sono stati considerati complessivamente 15 allevamenti per un totale di soggetti allevati pari a 1.394.159, di cui 690.737 erano in gabbie tradizionali, 688.929 in gabbie arricchite e 14.493 allevati in un unico allevamento a terra.

Tutti i soggetti, così come riferito in precedenza, appartengono alla stessa linea genetica e sono stati forniti tutti dalla stessa azienda; così come il mangime somministrato aveva le stesse caratteristiche in tutti gli allevamenti presi in considerazione. Le strutture e le dimensioni delle aziende sono risultate varie; mediamente, dai sopralluoghi effettuati, tutti gli allevamenti sono risultati in buone condizioni anche da



un punto di vista igienico sanitario. Il numero di soggetti controllati è sembrato molto indicativo e comunque i controlli sono stati accettati su base volontaria.

In relazione alle prestazioni produttive, tenuto conto che il numero di soggetti allevati nelle due principali tipologie considerate è quasi uguale, si nota una diversa percentuale media di mortalità. Come si nota dalle relative tabelle, nel caso degli allevamenti con gabbie tradizionali la percentuale di mortalità è relativamente superiore: infatti si riscontra una differenza pari a 2,49 punti percentuali in più rispetto all'allevamento in gabbie arricchite. Questo dato potrebbe essere leggermente sfalsato dal fatto che durante il ciclo di produzione nei due allevamenti con maggior mortalità si sono riscontrati problemi al sistema di ventilazione. Resta comunque il fatto che solo in tre allevamenti con gabbie tradizionali (n.1, n.5, n.10) si è riscontrata una mortalità simile a quella verificatasi a quella nelle gabbie arricchite ( $x$  medio= 5%).

Per quanto riguarda l'età, sia di accasamento che di macellazione, non si sono riscontrate differenze significative tra tipologie di allevamento; ciò significa che il periodo produttivo non è influenzato dal sistema prescelto.

Il consumo di mangime in media è stato superiore nel caso degli animali allevati in gabbia tradizionale di circa 0,68 g *pro capite* rispetto a quelli allevati in gabbie arricchite. Analogamente il numero di uova prodotte per singolo capo dagli animali in gabbia tradizionale (314,16) risulta inferiore rispetto a quello prodotto dagli animali allevati in gabbie arricchite (320,84), con addirittura un picco massimo nel caso dell'allevamento n.1 (Tab. III) pari a 342,5 uova/capo; bisogna però notare che in questo allevamento si è pure riscontrata la percentuale di mortalità più bassa rispetto alla media e pertanto possiamo supporre che tali dati siano influenzati da un'ottima gestione (che risulta sempre il parametro in grado di fare la differenza). Al contrario, nel caso degli allevamenti con gabbie tradizionali, le produzioni più basse, che si aggirano intorno a 293 uova circa per gallina, coincidono con gli allevamenti nei quali si è riscontrato un elevato tasso di mortalità.

Nel caso del peso medio delle uova, se pur con lieve differenza, si evidenzia un maggior peso in quelle prodotte da galline allevate in gabbie tradizionali, in particolar modo si è ottenuta una media di 62,25 g, contro i 61,76 g di quelle prodotte da galline allevate in gabbie arricchite.

Per quanto concerne l'indice di conversione relativo al numero di uova prodotte per ogni singola gallina, i dati risultano sovrapponibili (126,55 Vs 126,31).

Il dato invece di fondamentale importanza da un punto di vista produttivo coincide con l'indice di conversione kg/kg, corrispondente al rapporto tra il peso in kg del mangime consumato rispetto ai kg di uova prodotte per ogni singola gallina. Questo indice di conversione rappresenta il più importante dato tecnico di un qualsiasi allevamento, rappresentando il mangime la voce di costo maggiore, per essere considerato buono tale valore deve essere inferiore a 2,05, come è risultato in effetti dal presente studio (allevamenti con gabbie tradizionali: 2,024, allevamenti con gabbie arricchite: 2,046). Nell'allevamento a terra il valore è risultato più elevato (2,115), ma, ancorché da noi non controllato, sembra esserci una compensazione rappresentata dal maggior numero di uova commerciabili per diminuzione soprattutto di quelle rotte.

## CONCLUSIONI

Il dato comune a tutti gli allevatori conosciuti in questa ricerca è costituito dalla passione con la quale gestiscono i propri animali nonostante i non entusiasmanti

guadagni causati dal medio-basso prezzo delle uova pagato dal mercato.

Volendo raggruppare le indicazioni emerse da questo studio possiamo dire che il campione esaminato ci è sembrato sufficientemente indicativo per mettere in evidenza le differenze produttive delle galline allevate in gabbie tradizionali o arricchite. La recente introduzione del sistema di allevamento a terra o in “aviario” non ha permesso di individuare un campione di tale tipologia sufficiente per paragonarlo alle due soluzioni di allevamento oggi più diffuse.

Data per scontata una omogenea gestione degli allevamenti presi in considerazione in questo studio e tale da considerarsi buona a tutti gli effetti (trattasi di allevatori di grande esperienza), le differenze da noi riscontrate meritano di essere valutate separatamente.

Il dato più importate per l'allevatore, come noto, è rappresentato dal costo dell'alimento. Dal nostro confronto non risultano differenze significative a questo proposito, se non un leggero miglioramento nell'indice di conversione delle galline allevate in gabbie tradizionali, mentre il numero delle uova prodotte è a favore delle gabbie arricchite.

Rimangono in sospeso i risultati dell'allevamento a terra causa, come più volte ripetuto, l'esiguità del numero di animali e di allevamenti di tale tipologia valutati ed è evidente come la gestione in questo caso non sia ancora standardizzata. Nel caso considerato solo la mortalità ha mostrato valori accettabili, mentre tutti i dati produttivi sono risultati svantaggiosi rispetto alle produzioni ottenute in gabbia.

Sarebbe interessante valutare anche dal punto di vista economico i dati riscontrati, ma l'obiettivo di questa ricerca non era incentrato su tali aspetti, per l'analisi dei quali si rimanda ad una successiva valutazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

Anonimus, Guida di allevamento 2009-2011 Hy-Line Variety Brown.

Ensminger M. E. (1992), Poultry Science: 281-304, Prentice Hall College Div.

Meluzzi A. (2008) Allevamento della gallina ovaiole in “AA.VV. Avicoltura e Conigliicoltura”: 297-327, Point Veterinaire Italie, Milano.

Gallazzi D. (2009) Biosicurezza in AA.VV. Manuale di Patologia Aviaria: 47-51, Point Veterinaire Italie, Milano.

Fossati P. (2008) La normativa a tutela del benessere degli animali da reddito in Pezza F., Ruffo GC, Fossati P. Diritto e Legislazione Veterinaria: 320-327, Point Veterinaire Italie, Milano.

## **INNOCUITÀ ED EFFICACIA PROTETTIVA DEL CEPPA ATTENUATO SALMONELLA GALLINARUM SGP695AV NEL POLLO.**

Legretto M.<sup>1</sup>, Circella E.<sup>1</sup>, Caroli A.<sup>1</sup>, Pugliese N.<sup>1</sup>, Meliota F.<sup>2</sup>, Lozito P.<sup>2</sup>, Camarda A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"*.

<sup>2</sup> *Fatro . Ozzano dell'Emilia, Bologna*

*Corresponding Author: Antonio Camarda, Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro" S.p. per Casamassima Km 3, Valenzano Bari.*

*Email: antonio.camarda@uniba.it*

### **SUMMARY**

#### **Safety and protective efficacy of the attenuated strain *Salmonella gallinarum* SGP695AV in chickens.**

Fowl typhoid, caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum, causes heavy economic loss to the industrial poultry farms due to its strong impact in terms of mortality and morbidity. Furthermore, its management is quite difficult, as the infectious agent may remain in the poultry farms even during sanitary breaks. Therefore, many Countries have implemented strict preventive measures, leading the disease to be eradicated in many Western Countries. Notwithstanding, fowl typhoid is still widely diffused in the Mediterranean Countries, and in Africa, Asia and South America as well. Among the preventive measures needed to control the disease, the vaccination plays a pivotal role. To date, the only available vaccine consists of a rough strain of *S. Gallinarum*. The aim of this work was to assess the protective efficacy and safety of a live attenuated strain, termed SGP695AV.

At T0 and 15 days after (T15),  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^9$  and  $2 \times 10^{11}$  UFC of SGP695AV were administered *per os* to three groups of 12 30-day old laying hens, termed A, B and C, respectively. On the other hand, a verified pathogenic *S. Gallinarum* strain, SG354 were administered *per os* to another group, termed P, at T0. An equal volume of physiological solution was administered to the group N at T0 and T15. Thirty-seven days after the first administration (T37), 5 randomly chosen chickens from the groups A, B, C and P were humanly sacrificed to evaluate the presence of SGP695AV in livers, spleens and guts. Contemporarily, the other animals of groups A, B, C and N were inoculated *per os* with  $1 \times 10^{13}$  UFC of SG354. Everyday, each animal was observed to assess its clinical score on the basis of its symptomatology.

Serological test by rapid serum agglutination was performed at T0, T15, T37 and 15 days after administration of SG354 (T52). Daily, cloacal swabs were collected to evaluate the fecal excretion of SGP695AV and/or SG354.

The data we gathered showed that vaccine did not cause significant adverse effects in chicken. Before T37, Clinical scores was low in A, B and C groups, even when higher doses of the vaccinal strain were administered. Contrarily, the clinical score

of the group P between T15 and T37 was up to 200 times higher than those of the groups A, B and C. After infection with SG354, the clinical scores remained low in the three vaccinated groups.

The excretion of SGP695AV was low and limited to the first 15 days. The fecal elimination of SG354 after T37 was equally low in the groups A, B and C, while was significantly more consistent in the group N.

Finally, the serological analyses evidenced that SGP695AV induce a significant seroconversion, which was higher at T15.

On aggregate, our data showed that SGP695AV is effective and safe, as it is preventive towards fowl typhoid and it did not cause evident adverse effects. Further analyses should assess if the protection which SGP695AV confers may be long-termed and if it could be suitable for a wide scale usage.

## **INTRODUZIONE**

La Pullurosi/Tifosi aviare rappresenta fin dalle origini dell'industria avicola moderna una delle cause più frequenti e più temute di riduzione della redditività aziendale (Barrow and Neto, 2011). La malattia una volta comparsa, tende a radicarsi in allevamento, ripresentandosi nei cicli successivi specie nel momento di massima produzione .

Le perdite economiche, legate ai costi per le cure necessarie al controllo della malattia, alla riduzione della produttività del gruppo, alla mortalità, alle misure di polizia veterinaria previste ed implementate dalle Autorità sanitarie e al calo d'immagine per l'azienda, incidono pesantemente sul bilancio dell'allevamento.

In molte Nazioni, il ricorso alla profilassi di stato, volta ad individuare ed eliminare i gruppi portatori, ha consentito di ottenere una consistente riduzione della diffusione della malattia senza giungere all'obiettivo definitivo della sua eradicazione (Shivaprasad, 2000). La Tifosi, pertanto, è ancora frequentemente segnalata in Africa, Asia e Centro-Sud America (Kang et al., 2012), mentre in Europa resta diffusa nelle regioni mediterranee del continente (Pugliese et. al, 2011).

Uno dei mezzi utilizzati per combattere questa salmonellosi, consiste nel ricorso al monitoraggio sistematico dei riproduttori, nonché all'effettuazione di profonde e radicali disinfezioni di ambienti e attrezzature, associate ad un vuoto sanitario durevole (Shivaprasad, 2000). Tuttavia, molto spesso, per motivi di carattere economico, quest'ultimo appare difficile da realizzare sul campo, dove è comune il riscontro di allevamenti o gruppi di galline ovaiole multietà. La possibilità di individuare ed eliminare tutti i fomite di infezione è praticamente irrealizzabile.

Da alcuni anni in molti Paesi, ai citati provvedimenti di profilassi igienico-sanitaria è stata aggiunta la vaccinazione; questo soprattutto negli allevamenti commerciali, specie quelli a vita produttiva lunga, come ad esempio le galline ovaiole.

Nel passato, la profilassi immunitaria è stata affidata a vaccini spenti, i quali, somministrati per via parenterale non hanno però sortito gli effetti sperati (Lee et al., 2005).

Più recentemente vengono utilizzati in molte aree del mondo vaccini vivi, basati su ceppi di *Salmonella gallinarum* in fase rugosa, con risultati migliori rispetto ai vaccini spenti nel ridurre l'impatto della forma clinica della malattia (Kwon et Cho, 2011, Lee, et al., 2005, 2007, Silva, et al, 1981) .Questi risultati hanno incoraggiato la ricerca di ceppi attenuati di *S. pullorum/gallinarum*, più efficaci per

via non parenterale, che potessero mostrare i requisiti idonei per essere impiegati come principi attivi per vaccini vivi contro la Tifosi aviare.

La selezione sequenziale di Salmonelle fagocitate da granulociti neutrofilo di mammiferi (Roof et al, 1992) o da eterofili di pollo (Kramer, 1998, Kramer et Hirl, 2001), si è dimostrata un metodo efficace di attenuazione di ceppi di Salmonelle patogene per diverse specie animali.

In questo contesto si inquadrano le attività riportate in questo lavoro volte a testare, in trials preliminari di laboratorio, l'innocuità e l'efficacia protettiva di un ceppo di *S. gallinarum* (SGP695AV), attenuato per adattamento ad eterofili di pollo, somministrato *per os* a polli di 37 giorni di vita.

## MATERIALI E METODI

**Animali.** Sono stati utilizzati 60 polli SPF di 30 giorni di vita, privi di anticorpi anti *S. gallinarum*. Al momento dell'accasamento gli animali sono stati suddivisi in cinque gruppi formati ciascuno da 12 soggetti, scelti casualmente; ad ogni soggetto è stato assegnato un numero riportato su un anello posto alla zampa sinistra.

Ciascun gruppo è stato accasato in un diverso ambiente, a terra, su lettiera di truciolo di legno. La temperatura e un idoneo ricircolo d'aria sono stati garantiti da sistemi di condizionamento ad aria forzata e lampade ad infrarossi.

I gruppi sono stati nominati rispettivamente A, B, C, P ed N.

**Piano sperimentale.** La sperimentazione ha avuto inizio dopo un periodo di adattamento dei pulcini di una settimana. Lo schema sperimentale è riportato in tabella 1.

Gruppo	Via di Somministr.	Somministrazione di SGP695AV		Challenge
		T0	T15	T37
		Dose	Dose	Dose
Gruppo A	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>7</sup> UFC/ml SGP695AV	2 X 10 <sup>7</sup> UFC/ml SGP695AV	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354
Gruppo B	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>9</sup> UFC/ml SG695AV	2 X 10 <sup>9</sup> UFC/ml SGP695AV	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354
Gruppo C	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>11</sup> UFC/ml SGP695AV	2 X 10 <sup>11</sup> UFC/ml SGP695AV	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354
Gruppo Controllo Positivo	<i>per os</i>	2 X 10 <sup>11</sup> UFC/ml SG-354-	Nessuna somministrazione	-
Gruppo Controllo Negativo	<i>per os</i>	Soluzione fisiologica	Soluzione fisiologica	1x 10 <sup>13</sup> UFC/ml SG-354

**Tabella 1. Schema sperimentale adottato.**

A T0 e a T15 ai gruppi A, B e C è stata somministrata mediante gavage nel gozzo una dose di *S. gallinarum* SGP695AV rispettivamente alla dose di  $2 \times 10^7$  UFC/ml,  $2 \times 10^9$  UFC/ml e  $2 \times 10^{11}$  UFC/ml.

Contestualmente, a T0 gli animali del gruppo P (Controllo Positivo) sono stati sperimentalmente infettati con un ceppo patogeno di campo di *S. gallinarum* denominato SG354 isolato presso la Sezione di Patologia Aviaria del Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia dell'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro". L'infezione è avvenuta per via orale mediante gavage nel gozzo, alla dose di  $2 \times 10^{11}$  UFC.

Il gruppo N è stato tenuto come Controllo Negativo non infettato/non vaccinato.

A T37, 5 soggetti dei gruppi A, B, C, P, sono stati sacrificati mediante eutanasia e sottoposti ad esami necroscopici e batteriologici per la presenza di *Salmonella gallinarum* a partire da fegato, milza ed intestino.

**Challenge.** Al fine di valutare l'efficacia protettiva del ceppo SGP695AV, a T37 è stato effettuato sui polli rimasti dei gruppi A, B, C e su un pari numero di animali del gruppo N un challenge con il ceppo di *S. gallinarum*, SG354 alla dose di  $1 \times 10^{13}$  UFC/ml, somministrato con le modalità precedentemente descritte (il gruppo successivamente al challenge è stato denominato Gruppo non vaccinato/infettato). Gli animali sono stati sottoposti ad osservazione per un periodo di 15 giorni, al termine del quale sono stati sacrificati. Sulle carcasse sono stati eseguiti esami autoptici e microbiologici.

#### **Metodo di valutazione della sintomatologia e della mortalità (Clinical score).**

Giornalmente è stata registrata sintomatologia clinica (Abbattimento, stato del sensorio/anoressia) ed eventuale mortalità di ogni animale.

Ciascun pollo ha ricevuto una osservazione/giorno. Per il calcolo delle osservazioni si è operato nel seguente modo:

12 animali per gruppo = 12 osservazioni per gruppo al giorno, moltiplicato x il numero dei giorni di sperimentazione. In tal modo è stato ottenuto, per gruppo, il numero di osservazioni totali.

Ai sintomi ed alla mortalità è stato assegnato un punteggio come di seguito indicato:

1: per ogni giorno in cui il soggetto presentava abbattimento

2: per ogni giorno in cui il soggetto presentava diarrea

20: per ogni soggetto deceduto.

Il valore del punteggio finale è stato ottenuto calcolando il punteggio della sintomatologia clinica ed espresso come somma di punteggi o come percentuale in rapporto al numero delle osservazioni effettuate nel periodo considerato.

**Esami sierologici.** Esami sierologici per la ricerca di anticorpi nei confronti di *Salmonella gallinarum* sono stati allestiti a partire da campioni di sangue prelevati dagli animali dei gruppi A, B, e C ai tempi T0, T15, T37 e 15 giorni dopo il challenge. È stato utilizzato il test di agglutinazione rapida su vetrino (SAR) impiegando 2 differenti antigeni *Salmonella pullorum*, forniti rispettivamente da Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna e da Intervet (SP Antigen).

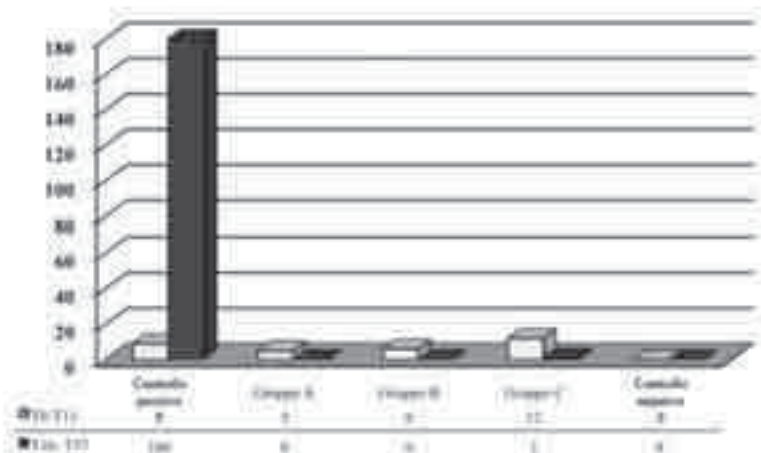
**Esami batteriologici per la ricerca di *S. gallinarum*.** Giornalmente, per l'intero periodo della sperimentazione, prima e dopo il challenge, sono stati eseguiti a partire da tutti gli animali tamponi cloacali per verificare l'eventuale escrezione fecale di *Salmonella gallinarum*.

Gli esami microbiologici sono stati effettuati, oltre che dai tamponi cloacali, anche a partire da fegato, milza, intestino, polmone, rene e midollo osseo dei soggetti deceduti e di quelli sacrificati. I tamponi cloacali e i campioni d'organo sono stati inoculati in terreno di prearricchimento, acqua peptonata tamponata (Buffered peptone water). Da tutti gli organi, inoltre, tranne che dall'intestino, al fine di reisolare la Salmonella sono state allestite semine dirette su terreni selettivi/differenziali Agar Verde Brillante (AVB)( Oxoid) ed Hektoen Enteric Agar (HE) (Oxoid), incubati a 37° C. Dai terreni di prearricchimento i campioni sono stati seminati su Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth (Oxoid) ed incubati a 41° C per 24 ore. Anche questi successivamente sono stati ripassati su AVB ed HE e posti a 37° C per 24 ore.

Le colonie sospette provenienti sia dai campioni arricchiti che da semina diretta sono state ripassate su agar nutritivo e successivamente sottoposte a test biochimici di identificazione mediante API20E (Biomérieux).

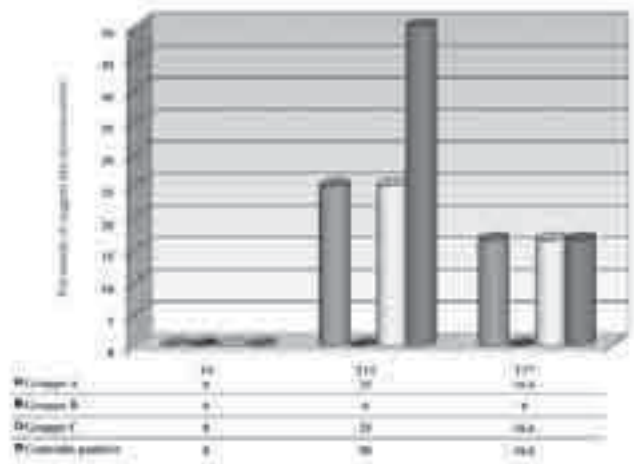
## RISULTATI

Gli animali dei gruppi A, B e C hanno reagito alla somministrazione con il ceppo SGP695AV manifestando una sintomatologia scarsa o inapparente, evidenziabile solo con lieve abbattimento e occasionale diarrea, fino alla seconda settimana di sperimentazione. Il *clinical score* è risultato in generale molto basso in tutti e 3 i gruppi; il punteggio più elevato è stato ottenuto dal gruppo C, che aveva ricevuto la dose più alta di SGP695AV. In ogni caso nessun animale è deceduto a seguito della somministrazione di SGP695AV. Diversa la situazione nel gruppo di controllo P, in cui la somministrazione del ceppo di campo SG354 ha determinato la comparsa di una grave forma clinica in tutti gli animali del gruppo, a partire dalla seconda settimana, con apice tra il 17° e il 25° giorno. Il gruppo di controllo negativo, in accordo con le aspettative, non ha manifestato alcuna sintomatologia (Fig. 1).



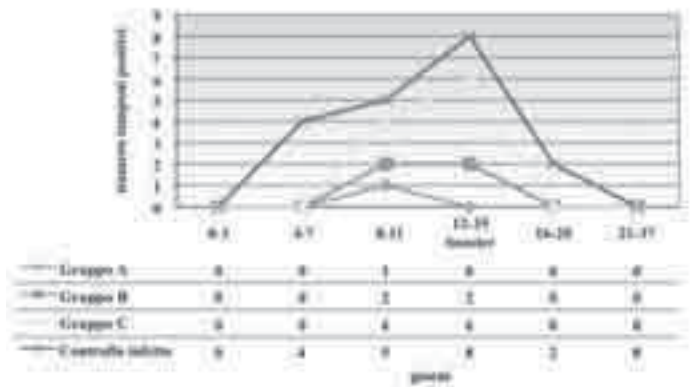
**Figura 1. Sintomatologia (espressa in punteggio per gruppo) osservata in pulcini che hanno ricevuto SGP695AV a dosi differenti rispetto a un gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo SG354.**

Gli esami sierologici per la ricerca di anticorpi specifici anti *S. pullorum/gallinarum* hanno evidenziato la presenza significativa di anticorpi nel 25% degli animali dei gruppi A e C al tempo T15, valore che si è ridotto al 16,6% al tempo T37; questo dato indica che il richiamo al tempo T15 con SGP695AV non ha determinato un aumento del numero di soggetti sieropositivi alla sieroaagglutinazione. Nel gruppo B nessun soggetto ha sierconvertito. Nel gruppo di controllo P, al tempo T15, il 50% degli animali era sieropositivo; anche questo valore si è ridotto al tempo T37 (Fig. 2).



**Figura 2. Risposta anticorpale di polli ad una doppia somministrazione di SGP695AV e di un gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo SG354**

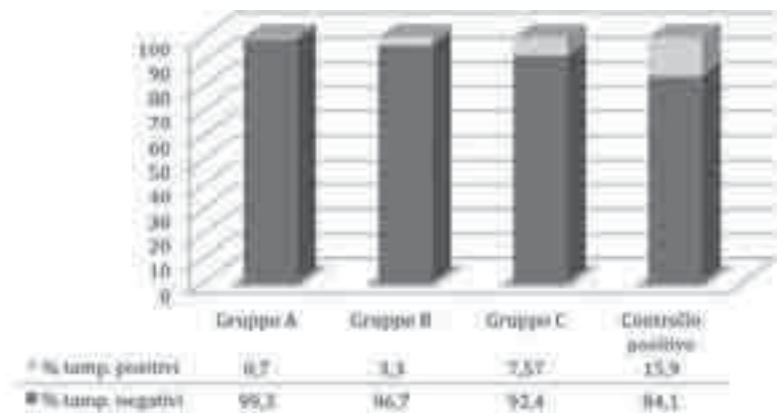
L'eliminazione del ceppo SGP695AV è risultata occasionale e limitata ai primi 15 giorni di sperimentazione (Fig. 3).



**Figura 3. Escrezione fecale di SGP695AV in gruppi di polli vaccinati per os a dosi differenti e di *S. gallinarum* di campo (SG354) nel gruppo di controllo positivo .**



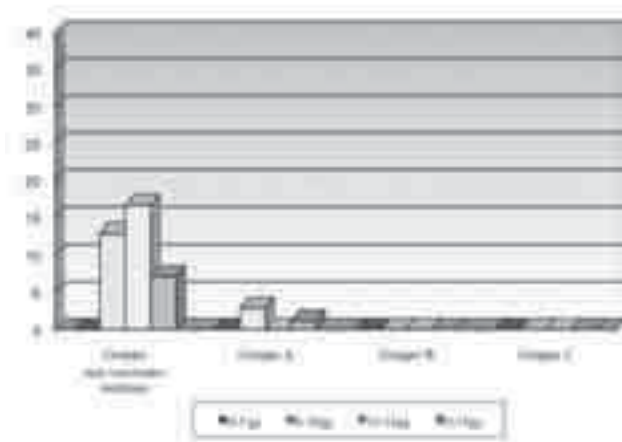
I soggetti del gruppo A hanno eliminato la salmonella in minor percentuale (0,7%), quelli del gruppo C in percentuale maggiore (7,57%). Molto più elevata l'escrezione della Salmonella con le feci da parte del gruppo di controllo positivo (15,9%) (Fig. 4).



**Figura 4. Percentuale di tamponi positivi a SGP695AV in 3 gruppi di polli che hanno ricevuto dosi differenti di SGP695AV e di un gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo SG354**

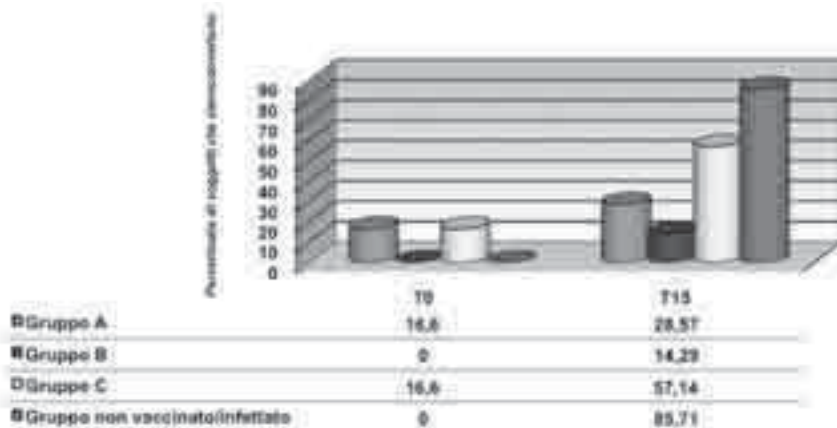
A distanza di 37 giorni dalla somministrazione il ceppo SGP695AV è stato reisolato dalla milza di 3 soggetti del gruppo C e da fegato e milza di 1 soggetto dei gruppi A e B.

L'infezione sperimentale dei gruppi A, B, e C con il ceppo di campo SG354 ha indotto sintomatologia clinica solo in un animale del gruppo A tra il 6° e il 10° giorno (Fig. 5).



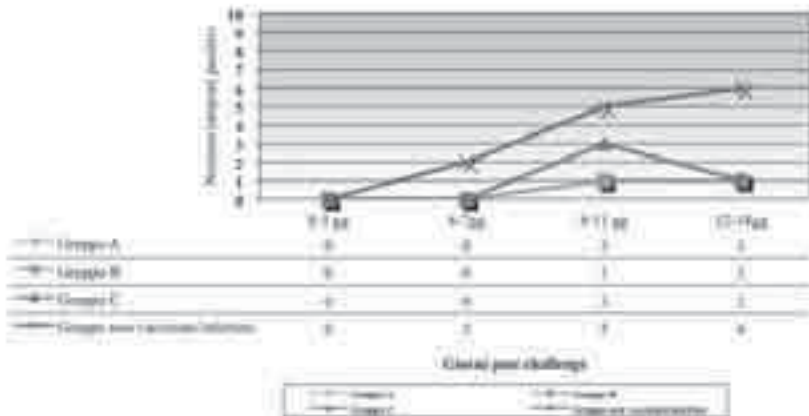
**Fig.5. . Clinical score (espresso come % sul numero di osservazioni/gruppo) di gruppi vaccinati con SGP695AV ed infettati con il ceppo di campo SG354.**

Gli animali dei tre gruppi hanno inoltre sierconvertito, manifestando a 15 giorni dall'infezione con il ceppo di campo anticorpi nei confronti di *S. gallinarum* in percentuali variabili. I polli del gruppo C hanno mostrato la maggiore percentuale di conversione sierologica (57,14%) (Fig. 6).

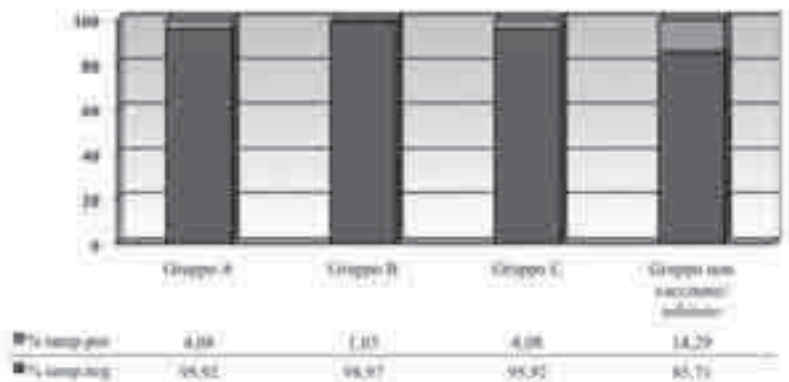


**Figura 6. Sieroconversione di polli vaccinati con SGP695AV ed infettati con *S. gallinarum* di campo (SG354)**

Nei 15 giorni post challenge solo il 4,08% dei tamponi cloacali dei gruppi A e C e l'1,03% del gruppo B è risultato contaminato dal ceppo di *S. gallinarum* di campo. L'escrezione del germe da parte del gruppo di controllo, oltre che persistente (Fig. 7) è stata significativamente superiore anche da un punto di vista quantitativo, giungendo nel complesso ad una percentuale del 14,29% (Fig. 8).



**Figura 7. Escrezione attraverso le feci della *Salmonella gallinarum* SG354 di campo dopo challenge di gruppi vaccinati con una doppia dose di SGP695AV**



**Figura 8. Percentuale di tamponi positivi a *Salmonella gallinarum* di campo (SG354) in gruppi di polli che hanno ricevuto dosi differenti di SGP695AV e in un gruppo di controllo non vaccinato (il dato è espresso in % di positività rispetto al numero di tamponi eseguiti).**

Il ceppo di *S. gallinarum* di campo, ricercato dagli organi degli animali del controllo positivo e dei polli dei gruppi A, B e C, sacrificati dopo 14 giorni dal challenge, è risultato, come atteso, persistente soprattutto nei soggetti del gruppo di controllo, essendo stata isolata da 6 soggetti su 7. Al contrario questa positività è risultata notevolmente inferiore negli animali dei gruppi A, B e C (rispettivamente 1 pollo per i gruppi A e C, e 2 per il gruppo B).

## DISCUSSIONE

La sperimentazione effettuata dimostra la piena innocuità del ceppo di *Salmonella gallinarum* SGP695AV somministrato *per os* alle dosi di  $2 \times 10^7$  UFC/ml,  $2 \times 10^9$  UFC/ml e  $2 \times 10^{11}$  UFC/ml in polli di 37 giorni di vita.

Il ceppo impiegato, infatti, nonostante la giovane età dei polli dimostra un elevato grado di attenuazione, inducendo solo una sintomatologia occasionale e comunque transitoria nei gruppi trattati. Il *clinical score*, è, infatti, pressoché sovrapponibile a quello di soggetti non vaccinati anche se è possibile evidenziare una certa dipendenza della reazione vaccinale in funzione della dose di SGP695AV ricevuta dagli animali.

La somministrazione di un richiamo conferma la totale innocuità del ceppo SGP695AV. In particolare, dopo la seconda dose, gli animali non presentano alcuna sintomatologia riferibile alla malattia.

La dose utilizzata sembra influenzare l'escrezione del ceppo SGP695AV. Gli animali che hanno ricevuto una dose di  $1 \times 10^7$  eliminano SGP695AV in numero inferiore rispetto a quelli che hanno ricevuto dosi più alte. In ogni caso, l'eliminazione della *S. gallinarum* SGP695AV con le feci è limitata nel tempo e ridotta ai primi 15 giorni dalla prima somministrazione. Il richiamo sembra non influire sull'escrezione del ceppo che si esaurisce completamente entro una settimana dalla seconda somministrazione. L'escrezione della *Salmonella* con le

feci è molto più alta e persistente nei polli del gruppo di controllo infettato con il ceppo di campo.

Questi polli sembrano convertire in maggior numero rispetto a quelli dei gruppi che hanno ricevuto la *Salmonella* SGP695AV, in cui la produzione di anticorpi agglutinanti è rilevabile nel 25% degli animali dopo 15 giorni. La stessa persistenza degli anticorpi è ridotta se si considera che, dopo 37 giorni di sperimentazione e 2 somministrazioni, sia nel gruppo A che nel gruppo C presentano anticorpi solo il 16,6% degli animali.

Questo dato sembra correlato all'innocuità del ceppo SGP695AV che indurrebbe, dopo la somministrazione *per os*, una scarsa tendenza a stimolare la produzione precoce di anticorpi agglutinanti limitando la circolazione nell'organismo del germe e la sua colonizzazione negli organi interni. Questa caratteristica, tuttavia, non sembra influenzare negativamente l'efficacia immunizzante del ceppo SGP695AV che, a seguito del challenge, ha determinato una significativa riduzione del *clinical score* indipendentemente dalla dose impiegata per l'immunizzazione, rispetto al gruppo di controllo.

La somministrazione della *Salmonella* SGP695AV influenza anche l'escrezione del ceppo di campo. Dopo 14 giorni dal challenge, a fronte di una positività di 6 polli su 7 nel gruppo di controllo, solo 1 è ancora eliminatore nei gruppi A, B e C. Questi risultati sono confermati dall'esame del numero totale di tamponi positivi a *Salmonella gallinarum* che è stato estremamente contenuto in tutti e 3 i gruppi immunizzati rispetto al gruppo di controllo infetto.

## CONCLUSIONI

I risultati di questa sperimentazione dimostrano la piena innocuità e l'efficacia protettiva del ceppo SGP695AV su polli di 37 giorni di vita. Ulteriori indagini saranno necessarie per accertare l'immunità nella gallina ovaiole in condizioni di laboratorio e soprattutto di campo, al fine di poter giungere ad un impiego del ceppo in programmi di vaccinazione su larga scala.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barrow PA, Freitas Neto OC. 2011. Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol.*;40:1-13.
2. Kang MS, Kwon YK, Kim HR, Oh JY, Kim MJ, An BK, Shin EG, Kwon JH and Park CK. (2012). Differential identification of *Salmonella* enteric serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet. Microbiol.* In press.
3. Kramer T. (1998). Effects of heterophil adaptation on *Salmonella enteritidis* fecal shedding and egg contamination. *Avian Dis.*, 42:6-13.
4. Kramer T., Hirl M. (2001) Loss of virulence by eterophil-adapted *Salmonella pullorum*. *Avian Dis.*, 45:453-455.
5. Kwon HJ, Cho SH. 2011 Pathogenicity of SG 9R, a rough vaccine strain against fowl typhoid. *Vaccine.* 29:1311-8.
6. Lee YJ, Mo IP, Kang MS. (2005). Safety and efficacy of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine in young laying chickens. *Avian Pathol.* 34:362-6.
7. Lee YJ, Mo IP, Kang MS. (2007). Protective efficacy of live *Salmonella gallinarum* 9R

8. vaccine in commercial layer flocks. *Avian Pathol.* 36:495-8
9. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A, Camarda A. (2011). Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Gallinarum*. *J. Microbiol. Methods.* 85: 22-27
10. Roof M., Kramer T., Roth J., Minion F. (1992). Characterisation of a *Salmonella choleraesuis* isolate after repeated neutrophil exposure. *Am J. Vet. Res.* 53:1328-1332.
11. Silva EN, Snoeyenbos GH, Weinack OM, Smyser CF. (1981). Studies on the use of 9R strain of *Salmonella Gallinarum* as a vaccine in chickens. *Avian. Dis.* 25:38-52.
12. Shivaprasad HL. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 405-424.

# ATTIVITÀ ASSISTITE CON GLI ANIMALI E SALUTE PUBBLICA: MONITORAGGIO SANITARIO CONDOTTO NELL'AREA VERDE DI UN OSPEDALE PSICHIATRICO GIUDIZIARIO IN CAMPANIA

Menna L.F.<sup>1</sup>, Santaniello A.<sup>1\*</sup>, Borrelli L.<sup>1</sup>, Russo T.P.<sup>1</sup>, Fontanella M.<sup>1</sup>, Di Maggio A.<sup>2</sup>, Dipineto L.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università degli Studi di Napoli Federico II*

<sup>2</sup>*CRIUV, Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria, ASL Na1, Napoli, Italy.*

## Summary

The animal assisted activities (AAA) are aimed at improving the physical condition or mental patients. The presence of an animal can relieve stress, anxiety, fear, boredom and pain of people who come to find themselves in an uncomfortable situation. However, the contact with animals can be a source of zoonotic infections, especially when the animals are not subjected to regular microbiological controls. Our study therefore aims at monitoring the health of the animals housed in green area of Criminal Mental Hospital against zoonotic pathogens in order to assess the potential risk to operators, doctors and inmates themselves. The isolation of bacteria (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157) were conducted by cultural and molecular methods. Based on surveys conducted for the isolation of *Campylobacter* spp. 9 out of 70 samples were positive for *Campylobacter jejuni* with a prevalence of 12.9% (CI = 6.4 - 23.5%) of the samples analyzed. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157 were consistently negative. Animals investigated in our study could be potential vectors of zoonoses, with special reference to *C. jejuni* infection. Although it is well known from literature data that poultry is the main reservoir of *Campylobacter* spp., during the AAA contact with animals is frequent, so it is very important to focus on the regular health monitoring of animals, in order to protect public and animal health.

## INTRODUZIONE

L'utilizzo degli animali a fini terapeutici ha radici molto antiche e nel corso del tempo ha assunto un'importanza crescente. Il moderno termine di Pet Therapy si riferisce alla strutturazione metodologica del coinvolgimento di animali finalizzata al trattamento di specifiche patologie. Tali attività sono caratterizzate da una grande eterogeneità, sia per quanto riguarda il percorso formativo degli operatori, sia per la tipologia degli utenti e le modalità d'azione (Rapporti ISTISAN 07/35). La validità della Pet Therapy è stata sostenuta e riportata in diversi lavori scientifici condotti in contesti diversi, con soggetti depressi (Redefer e Goodman, 1989; Jessen et al, 1996), bambini autistici (Redefer e Goodman, 1989; Meluzzi et al, 2000), pazienti psichiatrici (Corson et al, 1975; McCandless et al, 1985; Beck e Rosemberg, 1986; Bardill e Hutchinson, 1997; Hall e Malpus, 2000), disturbi della comunicazione (Lundgren e Ugalde, 2004) e soggetti con disturbi organici, come le patologie cardiovascolari (Friedmann et al, 1980; Odendaal, 2000).

Da un punto di vista operativo, va scoraggiato l'utilizzo del termine Pet Therapy

perché troppo generico e usato per raggruppare tipologie di attività assai diverse, mentre si preferisce distinguere tra Animal Assisted Activities e Animal Assisted Therapies:

– Animal-Assisted Activities: “Attività svolte con gli Animali” (AAA), che hanno lo scopo di migliorare la qualità della vita di alcune categorie di persone (per esempio ciechi o portatori di handicap psico-fisici). Le AAA vengono effettuate in una vasta gamma di contesti ambientali da professionisti abilitati e para-professionisti e/o volontari di associazioni con specifiche caratteristiche che lavorano con animali.

– Animal-Assisted Therapies: “Terapie assistite con gli Animali” (TAA) o “Uso Terapeutico degli Animali da Compagnia” (UTAC), che affiancano alle terapie tradizionali l’utilizzo di animali con specifiche caratteristiche. Le TAA vengono utilizzate per migliorare lo stato fisico, sociale, emotivo e cognitivo di pazienti. Sono effettuate in ampi e differenti contesti e possono coinvolgere gruppi o singoli individui. Il procedimento viene inoltre documentato e valutato (Rapporti ISTISAN 07/35).

Recentemente, in Italia, la Pet Therapy è stata proposta e utilizzata anche negli Ospedali Psichiatrici Giudiziari (OPG) (AA.VV. 2012). Questi rappresentano una vera e propria comunità di persone che per vari motivi vivono in condizioni di frustrazione, abusi, malattie mentali associate a malattie infettive come l’AIDS, che compromettono il sistema immunitario. Nell’ambito di un OPG, le attività di Pet Therapy di solito si svolgono in una zona verde dove vengono eseguiti anche altri tipi di attività per migliorare le condizioni di vita dei detenuti quali il giardinaggio e la cura degli animali. Se è vero che la presenza di animali domestici in strutture sanitarie è stata associata ad un coinvolgimento emotivo positivo di tutta la comunità, compreso il personale medico e paramedico, il contatto con essi potrebbe essere una fonte di infezioni zoonosiche, soprattutto quando gli animali non sono sottoposti a periodici controlli sanitari e, in particolare, quando le persone coinvolte sono immunodepresse e/o immunocompromesse. Pertanto, il presente studio è stato effettuato con lo scopo di valutare la presenza di *Campylobacter* termotolleranti, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157 nel pollame allevato nell’OPG Aversa, nel Sud Italia considerando soprattutto il potenziale rischio zoonosico per gli operatori, i medici e gli stessi detenuti.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

La presente indagine è stata effettuata nel periodo febbraio-giugno 2011 nel pollame allevato nell’area verde dell’OPG di Aversa, Sud Italia, dove si trovano un totale di circa 300 animali, costituiti da ovini e caprini, conigli, polli e anatre, tra cui alcune specie selvatiche, come germani reali e Anatre mute. Sono stati sottoposti a campionamento 70 animali di cui 19 germani reali (*Anas platyrhynchos*), 18 anatre mute (*Cairina moschata*), 11 fagiani (*Phasianus colchicus*), 7 oche (*Anser anser*), 15 polli (*Gallus gallus domesticus*). Sono stati effettuati tre tamponi cloacali per ciascun animale, al fine di valutare la presenza di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ed *Escherichia coli* O157, rispettivamente, per un totale di 210 campioni. I tamponi cloacali sono stati eseguiti su ogni uccello con tamponi sterili e trasportati in laboratorio al massimo entro 2 ore dal prelievo.

#### *Isolamento e identificazione di Campylobacter spp.*

I Campioni sono stati inoculati in *Campylobacter* enrichment broth (Oxoid) e incubati a 42°C per 48 ore in condizioni di microaerofilia (CampyGen, Oxoid). Successivamente, ogni campione è stato seminato su Preston agar (CCDA, Oxoid). Dopo incubazione a 42°C per 48 ore in condizioni microaerofilia, le piastre sono state esaminate per valutare le tipiche colonie di *Campylobacter* termotolleranti. Le colonie sospette sono state seminate nuovamente su agar sangue (Oxoid) e, sempre rispettando le condizioni di microaerofilia, sono state infine incubate a 42°C per altre 24 h. In microscopia a contrasto di fase, le colonie comprendenti microrganismi mobili, ricurvi o a spirale sono stati presuntivamente identificati come *Campylobacter* termotolleranti e sottoposti a PCR. Il DNA è stato estratto da colonie isolate su agar sangue di pecora utilizzando il reagente PrepMan (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) seguendo le istruzioni consigliate dal produttore. La presenza specifica del genere *Campylobacter* era basata sull'amplificazione del gene *cadF* usando i primer *cadF2B*, 5'-TTG AAG GTA ATT TAG ATA TG-3' e *cadR1B*, 5'-CTA ATA CCT AAA GTT GAA AC-3' come descritto da Konkel et al. (1999). Tutti gli estratti di DNA venivano esaminati anche per la presenza delle specie *C. jejuni* e *C. coli* rispettivamente mediante i primer C-1, 5'-CAA ATA AAG TTA GAG GTA GAA TGT-3', C-4, 5'-GGA TAA GCA TAG CTA GCT GAT-3' e COL1, 5'-ATG AAA AAA TAT TTA GTT TTT GCA-3', COL2, 5'- ATT TTA TTA TTT GTA GCA GCG-3', come descritto da Winters et al. (1997) e Gonzalez et al. (1997). Le condizioni per la PCR erano calibrate come suggerito da Cloak & Fratamico (2002).

#### *Isolamento e identificazione di Salmonella spp.*

Per l'isolamento di *Salmonella* spp. è stata utilizzata la procedura ISO 6579:2002. In particolare, i tamponi cloacali sono stati inoculati in Buffered Peptone Water (BPW, Oxoid Ltd, UK) come pre-arricchimento e incubate a 37° C per 18-24 ore. I campioni positivi sono stati inoculati in Rappaport-Vassiliadis Broth (Oxoid Ltd), come terreno di arricchimento, e incubati a 42° C per 18-24 ore. Le colture venivano seminate su piastre di Xylose-lisina desossicolato Agar (Oxoid Ltd), incubato a 37° C ed esaminate dopo 24 ore. Le colonie sospette sono state poi seminate su un secondo agar selettivo, Brilliant Green Agar (Oxoid Ltd) e incubate a 37° C per 24 ore. Tutti i campioni sospetti sono stati sottoposti a test di identificazione biochimica utilizzando il sistema API20-E (bioMérieux, Francia).

#### *Isolamento e identificazione di Escherichia coli O157*

Tutti i campioni sono stati arricchiti in rapporto 1:10 in 10 ml di Tryptone Soy Broth modificato (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK) con novobiocina (Oxoid Ltd) e incubati a  $41 \pm 1$  ° C, per 12-18 ore. Ad 1 ml di ciascuna brodocoltura sono stati aggiunti a 20 µl di sfere immunomagnetiche rivestite con anticorpo anti O157 (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norvegia) e i preparati sottoposti a separazione immunomagnetica secondo le istruzioni del produttore. Infine, le sfere immunomagnetiche sono state inoculate su entrambi agar sorbitolo MacConkey (Oxoid Ltd) integrato con cefixime-tellurite (Oxoid Ltd) e E. coli O157 cromogenic Agar (Biolife Italiana Srl, Milano, Italia). Dopo incubazione a 37° C 18-24 h, sorbitolo-negative colonie sono stati selezionate e sottoposte a screening per la presenza dell'antigene O157 mediante agglutinazione con E. coli O157 latex kit (Oxoid Ltd).



## RISULTATI

Sulla base delle indagini condotte per l'isolamento di *Campylobacter* termotolleranti, 9 su 70 campioni sono risultati positivi per *C. jejuni* con una prevalenza del 12,9% (intervallo di confidenza = 6,4 al 23,5%) dei campioni cloacali analizzati. In particolare, i campioni positivi sono stati isolati da 4 polli e 5 germani reali. Per quanto riguarda *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157 i risultati sono stati sempre negativi. Tutti i risultati sono riportati nella tabella 1.

## DISCUSSIONE

*Campylobacter* termo tolleranti, *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157 sono stati i batteri oggetto del presente studio con risultati positivi per *Campylobacter* termotolleranti e negativi per quanto riguarda *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157. In particolare, *C. jejuni* è stato isolato in 9 campioni, di cui 4 polli e 5 germani reali. *Campylobacter* termotolleranti, *Salmonella* spp. ed *E. coli* O157 hanno un ampio range di ospiti negli uccelli e nei mammiferi (Caprioli et al., 2005). Questi batteri possono essere trasmessi all'uomo attraverso la contaminazione fecale di cibo, acqua e ambiente, o attraverso il contatto diretto con animali portatori. I *Campylobacter* termotolleranti, principalmente *C. jejuni* e *C. coli*, e *Salmonella* spp. sono i principali batteri responsabili di gastroenterite acuta nell'uomo, in particolare nelle persone con immunodeficienze primarie e anche in soggetti immunocompromessi, sottoposti a trattamenti con chemioterapia o radioterapia, destinatari di trapianto che assumono farmaci immunosoppressori, persone con leucemia, persone con malattie del sistema immunitario e malati di AIDS (Lund e O'Brien, 2011). *Salmonella* spp. è stata oggetto di studio in diverse specie animali, e in particolare nelle specie aviarie (Flament et al, 2012; Hanh TT et al, 2006; Oksenhendler et al, 2011; Pennycott et al, 2012). *Escherichia coli* O157 è un patogeno responsabile di grave tossinfezione alimentare riconosciuto a livello mondiale (Rasmussen e Casey 2001, Sargeant 2002, Simpson, 2002; LeBlanc 2003) associata a diarrea ematica, colite emorragica, sindrome emolitico uremica e porpora trombotica trombocitopenica (Caprioli et al, 1996; Paton e Paton, 1998; Karmali, 2004). I *Campylobacter* termotolleranti sono stati studiati in diverse specie animali, tra cui uccelli, e in particolare nel pollame, che è riconosciuto come uno dei principali serbatoi di infezione (Moran et al, 2009; Colles et al 2011; Lund e O'Brien, 2011; Adzitey et al, 2012; Simpson, 2002). I dati comparativi sulla prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nelle anatre sono piuttosto limitati, anche se questo microrganismo è stato segnalato in Malaysia (Adzitey et al., 2012), Irlanda del Nord (Moran et al., 2009), Canada (Van Dyke et al., 2010), con una prevalenza di 18,35%, 100%, e 57-79,0% rispettivamente. I dati sulla prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nel fagiano sono anche limitati, anche se questo microrganismo è stato segnalato in Germania (Atanassova & Ring, 1999), Russia (Stern et al., 2004), Repubblica Ceca (Nebola et al., 2007), Italia (Soncini et al ., 2006; Dipineto et al, 2008), con una prevalenza del 25,9%, 26,7%, 70,2% e 43,3% rispettivamente.

## CONCLUSIONI

Anche se è ben noto dai numerosi dati presenti in letteratura che il pollame è il principale serbatoio di *Campylobacter* termotolleranti ma è anche evidente ed inevitabile che durante le attività di Pet Therapy c'è un contatto con gli animali

trattati, quindi riteniamo che oltre all'utilità degli interventi di Pet therapy come co-terapia è essenziale prestare attenzione anche alla salute pubblica con particolare riferimento alla possibilità che gli animali possono rappresentare una fonte di infezione zoonosica, soprattutto per soggetti immunocompromessi o immunodepressi. È quindi necessario sottoporre gli animali coinvolti nelle attività di Pet Therapy a controlli sanitari periodici e, se necessario, a trattamento farmacologico, il tutto finalizzato alla tutela sanitaria degli animali e dell'uomo. A tal fine sarebbe auspicabile, quindi, stilare dei protocolli sanitari standardizzati che tengano conto delle modalità operative, durante le attività di Pet therapy, in relazione agli organismi patogeni agenti di zoonosi delle specie animali scelte per queste attività.

## BIBLIOGRAFIA

- Atanassova V and C Ring. (1999). Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. *Intern. J. Food Microbiol.* 51: 187-190.
- Adzitey F, Rusul G, Huda N, Cogan T and J Corry. (2012). Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Intern. J. Food Microbiol.* 154: 197-205.
- Bardill N and S. Hutchinson. (1997). Animal-assisted therapy with hospitalized adolescents. *J. Child Adolesc. Psychiatr. Nurs.* 10: 17-24.
- Beck S and R Rosenberg. (1986). Frequency, quality, and impact of life events in self-rated depressed, behavioral-problem, and normal children. *J. Consult. Clin. Psychol.* 54: 863-864.
- Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, Giammanco A, Arista S, Crotti D, Facchini M, Guglielmetti P, Piersimoni C and I Luzzi. (1996). Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. The Italian Study Group on Gastrointestinal Infections. *J. Pediatric Inf. Dis.* 15: 876-873.
- Caprioli A, Conendera G and C. Lucangeli. (2005). *Escherichia coli* O157 e altri *E. coli* Enteroemorraggici. In: Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Rondinelli E.G, Fabbi M, Marone P. (Eds). Pavia: Selecta Medica.
- Colles FM, Ali JS, Sheppard SK, McCarthy ND and MCJ Maiden. (2011). *Campylobacter* populations in wild and domesticated Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Envir. Microbiol. Rep.* 3: 574-580.
- Corson SA, Corson EO, Gwynne PH and LE Arnold. (1975). Pet-facilitated psychotherapy in a hospital setting. *Curr. Psychiatr. Ther.* 15: 277-286.
- Dipineto L, Gargiulo A, De Luca Bossa LM, Rinaldi L, Borrelli L, Menna LF and A Fioretti. (2008). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in pheasants (*Phasianus colchicus*). *Avian Pathol.* 37: 507-8.
- Flament A, Soubbotina A, Mainil J and D Marlier. (2012). Prevalence of *Salmonella* serotypes in male mule ducks in Belgium. *Vet. Rec.* 24: 311.
- Friedmann CT, Schiebel D and MT McGuire. (1980). Behavioral study of two patient groups during psychotherapy. *Psychol. Rep.* 47: 575-579.
- Hall PL and Z Malpus. (2000). Pets as therapy: effects on social interaction in long-stay psychiatry. *Br. J. Nurs.* 9: 2220-2225.
- Hanh Tran T, Nguyen T Thanh, Hoang Q Thoa, Le T Thi, Lam M Thuan and Nguyen TH Ly. (2006). Prevalence of *Salmonella* spp. in Poultry in Vietnam. *Ann.*

*N.Y. Acad. Sci.* 1081: 266–268.

Jessen J, Cardiello F and MM Baun. (1996). Avian companionship in alleviation of depression, loneliness, and low morale of older adults in skilled rehabilitation units. *Psychol. Rep.* 78, 339-348.

Karmali M.A., 2004. Infection by Shiga toxinproducing *Escherichia coli*: An overview. *Mol. Biotechnol.* 26: 117–122.

LeBlanc JJ. (2003). Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. *Crit. Rev. Microbiol.* 29: 277–296.

Lund BM and SJ O'Brien. (2011). The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 961-73.

Lundgren J and V. Ugalde (2004). The demographics and economics of complementary alternative medicine. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 15: 955-961.

McCandless P, McCready KF and L Knight. (1985). A model animal therapy program for mental health settings. *Ther. Recreation J.* 19: 55-63.

Meluzzi A, Boratti A, Lorenzetto S, and G Zolesi. (2000). Pet Therapy. Aiutarsi con gli animali. Omega Edizioni, Torino, Italia.

Moran L, Scates P and RH Madden. (2009). Prevalence of *Campylobacter* spp. in Raw Retail Poultry on Sale in Northern Ireland. *J. Food Prot* 9: 1830–1835.

Nebola M, Borilova G and I Steinhäuserova. (2007). Prevalence of *Campylobacter* subtypes in pheasants (*Phasianus colchicus* spp. *torquatus*) in the Czech Republic. *Vet. Med.* 52: 496-501.

Odendaal JS. (2000). Animal-assisted therapy: magic or medicine? *J. Psychosom. Res.* 49: 275-280.

Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viillard J, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Theodorou I, Rabian C and P Debré. (2008). Study Group Infections in 252 Patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clin. Inf. Dis.* 46: 1547–54.

Paton AW and JC Paton. (1998). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 598–602.

Pennycott TW, Park A and HA Mather (2006). Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. *Vet. Rec.* 158: 817-820.

Rapporti ISTISAN 07/35 (2007). *Terapie e attività assistite con gli animali: analisi della situazione italiana e proposta di linee guida*. A cura di Francesca Cirulli e Enrico Alleva, ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ, Roma.

Rasmussen MA and TA Casey. (2001). Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 57–73.

Redefer LA and JF Goodman. (1989). Brief report: pet-facilitated therapy with autistic children. *J. Autism. Dev. Disord.* 19: 461-467.

Renter DG and JM Sargeant. (2002). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: epidemiology and ecology in bovine production environments. *Anim. Health Res.* 3: 83–94.

Simpson VR. (2002). Wild Animals as Reservoirs of Infectious Diseases in the UK.

*Vet. J.* 163: 128-146.

Soncini G, Valnegri VL, Vercellotti L, Colombo F, Valle D, Franzoni M and C Bersani. (2006). Investigation of *Campylobacter* in reared game birds. *J. Food Prot.* 69: 3021-3024.

Stern NJ, Bannov VA, Svetoch EA, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Volozhantsev NV, Gusev VV and VV Perelygin. (2004). Distribution and characterization of *Campylobacter* spp. from Russian poultry. *J. Food Prot.* 67: 239-245.

Van Dyke MI, Morton VK, McLellan NL and PM Huck. (2010). The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1053–1066.

Tabella 1 - Numero di campioni positivi per numero animali secondo la specie.

Specie animali	<i>Campylobacter</i> spp.		<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>		
<i>Anas platyrhynchos</i>	5/19	0/19	0/19	0/19
<i>Cairina moschata</i>	0/18	0/18	0/18	0/18
<i>Anser anser</i>	0/7	0/7	0/7	0/7
<i>Phasianus colchicus</i>	0/11	0/11	0/11	0/11
<i>Gallus gallus domesticus</i>	4/15	0/15	0/15	0/15
Totale	9/70	0/70	0/70	0/70

## **CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE ISOLATI IN ITALIA TRA IL 1963 ED IL 1989**

Taddei R.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Boniotti M.B.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Fabbi M.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Forlì, Via Marchini, 1 – 47100 Forlì.*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Reparto di Genomica – Sede di Brescia, via Bianchi, 9 - 25124 Brescia.*

<sup>3</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Sezione Diagnostica di Pavia, Strada Campeggi 59/61- 27100 Pavia.*

### **Summary**

A retrospective study was carried out on 123 Infectious Bronchitis Virus strains isolated in Italy between 1963 and 1989. A portion of the S1 gene was amplified and sequenced in order to explore the genetic variability of the IBV strains circulating in those years. Genotype Massachusetts was the prevalent genotype in the mid '60s, since then 624/I became the prevalent genotype until the end of the '80s. D1466 was first detected in 1979, D274 in 1981 and 793B in 1989. During the '60s and '70s the presence of some variant strains was also highlighted.

### **INTRODUZIONE**

Il virus della Bronchite Infettiva Aviaria (IBV) è un coronavirus, prototipo della famiglia Coronaviridae, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto d'envelope. E' causa della bronchite infettiva aviaria (BI), patologia largamente diffusa e responsabile di elevate perdite economiche nell'allevamento intensivo del pollo. Si tratta di una malattia altamente contagiosa, caratterizzata da sintomi e lesioni respiratorie, che in alcuni casi può interessare anche gli apparati gastrointestinale ed uro-genitale causando nefropatie con alta mortalità e/o problemi alla deposizione e alla qualità del guscio dell'uovo nelle galline ovaiole. Il genoma del virus codifica per 4 proteine strutturali tra le quali la proteina S, ed in particolare il frammento S1, è la parte più esposta del virus che interviene nell'attacco alla cellula ospite, comprende la maggior parte dei determinanti antigenici ed è pertanto responsabile della formazione di nuove varianti. Il sequenziamento nucleotidico e l'analisi genetica di questa regione forniscono un metodo veloce ed accurato per la genotipizzazione di IBV, oltre ad uno strumento efficace per lo studio dell'epidemiologia molecolare del virus.

Il sierotipo Massachusetts della BI è stato isolato per la prima volta in Europa negli anni '40 (Cavanagh & Davis, 1993) mentre Petek, Paparella & Catelani, e Galassi descrissero contemporaneamente la BI per la prima volta in Italia nel 1956.

L'andamento della malattia nel nostro paese, riguardo la prevalenza e la gravità, è stato fluttuante negli anni. Alla virosi primaria respiratoria inizialmente osservata, a partire dagli anni '60 si aggiunse la sindrome "nefrite/nefrosi" dovuta a ceppi nefropatogeni (Pascucci et al., 1990). A questo periodo risale infatti la prima segnalazione di un nuovo sierotipo in Italia: il ceppo nefropatogeno 1731PV (Rinaldi et al., 1966). Durante gli anni '70 la BI si è andata gradualmente attenuando, Zanella segnalava in quegli anni la notevole diffusione del ceppo nefropatogeno AZ23/74 (Zanella, 1976). All'inizio

degli anni '80 si assiste invece ad una sensibile ripresa della malattia e durante tutto il decennio si sono moltiplicati gli isolamenti di ceppi differenti, tra i quali il 3794/Fo/83 (Pascucci et al., 1986a) associato a gravi forme respiratorie, ed utilizzato anche nei prodotti vaccinali. Negli anni '80 sono state isolate con una certa frequenza le varianti tipizzate in Olanda: il ceppo D207 (anche conosciuto come D274) ed il D212 (meglio conosciuto come D1466). In particolare, il sierotipo D274 risultava essere anche il più diffuso in alcuni paesi dell'Europa occidentale all'inizio e alla metà degli anni '80 (Cook, 1984; Develaar et al., 1984).

Il genotipo 793/B fu identificato per la prima volta in Inghilterra nel 1990/91 (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992), ma la sua presenza è stata retrospettivamente dimostrata in Francia a partire dal 1985 (Cavanagh et al., 1998), mentre nei primi anni '90 fu isolato anche in Messico e Thailandia (Cook et al., 1996).

Il sierotipo 624/I fu inizialmente descritto nel 1993 associato a forma respiratoria nel broiler (Capua et al., 1994), la successivamente caratterizzazione molecolare ha confermato che si trattava un nuovo genotipo (Capua et al., 1999). Questo lavoro rappresenta uno studio retrospettivo sui ceppi circolanti sul nostro territorio negli anni '60, '70 e '80, per comprendere meglio e per la prima volta in maniera così estesa, la variabilità genetica della popolazione di IBV presente di quegli anni.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Nel presente studio sono stati inclusi 123 ceppi di IBV isolati mediante inoculo di uova SPF presso le sezioni diagnostiche di Forlì e Pavia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna tra gli anni 1963 e 1989 e conservati sottoforma di liofilizzato o di liquido allantoideo stoccato a -80°C.

In tabella 1 sono riportati i ceppi inclusi nell'analisi suddivisi per anno di isolamento. Dei 123 ceppi compresi nell'analisi 37 sono stati isolati da episodi di nefrite-nefrosi.

Anno isolamento	Numero ceppi analizzati	Ceppi nefropatogeni	Anno isolamento	Numero ceppi analizzati	Ceppi nefropatogeni
1963	4	0	1977	1	1
1964	2	0	1978	1	1
1965	2	0	1979	4	0
1966	9	0	1980	3	2
1967	13	1	1981	4	0
1968	1	0	1982	6	0
1969	6	3	1983	15	4
1970	4	1	1984	5	3
1971	1	0	1985	6	4
1972	2	0	1986	3	2
1973	2	2	1987	6	3
1974	3	0	1988	6	3
1975	3	1	1989	8	4
1976	3	2	<b>TOTALE</b>	<b>123</b>	<b>37</b>

**Tabella 1.** Ceppi di IBV inclusi nell'analisi suddivisi per anno di isolamento. Per ogni anno di isolamento viene anche riportato il numero di ceppi nefropatogeni analizzati.

### *Caratterizzazione molecolare di IBV*

L'RNA totale è stato estratto dal liquido allantoideo o dal liofilizzato ricostituito in tampone PBS, utilizzando il kit di estrazione RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornita dalla ditta produttrice. L'RNA così estratto è stato sottoposto a due reazioni di RT-PCR:

- Reazione con primer universali per IBV (XCE1+, XCE3-; tabella 2), in grado di amplificare una porzione di 383 bp del gene S (Cavanagh et al., 1999) del virus. In particolare, utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®), in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 600nM di ogni primer 5µl di 5X Onestep RT-PCR Buffer, 0.4nM di ogni dNTP, 12.5U di inibitori delle Rnasi, 1µl di OneStep RT-PCR enzyme mix e 5µl di estratto di RNA. Profilo di amplificazione: 1 X (50°C, 30 min), 1 X (94°C, 15 min), 40 X (94°C, 30 sec; 55°C, 30sec, 72°C, 40 sec), 1 X (72°C, 10 min)
- Reazione con i primer D2- e D1+ (Tabella 2) specifici per il genotipo D1466 (Cavanagh et al., 1999) che differisce per circa il 50% della sequenza S1 da tutti gli altri genotipi. La PCR è stata eseguita con medesime concentrazioni della mix di reazione e con lo stesso profilo di amplificazione della PCR con i primer universali.

<b>Primer</b>	<b>Sequenza</b>	<b>Posizione in S1</b>
XCE2-	CTCTATAAACACCCTTACA	1168 to 1193
XCE1+	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	728 to 749
D2-	ATATGCCAAAACATCAGTG	636 to 654
D1+	AGAGTGCTATATCTTTTGTT	233 to 252

**Tabella 2.** Sequenza e posizione di annealing dei primer utilizzati in RT-PCR.

### *Sequenziamento ed analisi filogenetica*

Le reazioni di sequenza sono state approntate a partire dal prodotto PCR, previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit – QIAGEN®) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem®) secondo le istruzioni del produttore, in entrambe le direzioni ed impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione. Le reazioni di sequenza sono state sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga 3130 (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v7.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA).

L'analisi filogenetica è stata eseguita su tutti gli amplificati ottenuti mediante primer universali, con metodo Neighbour-joining utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011). Il valore di bootstrap considerato nell'analisi, per associare un valore di affidabilità ai rami dell'albero, è di 1000 replicati.

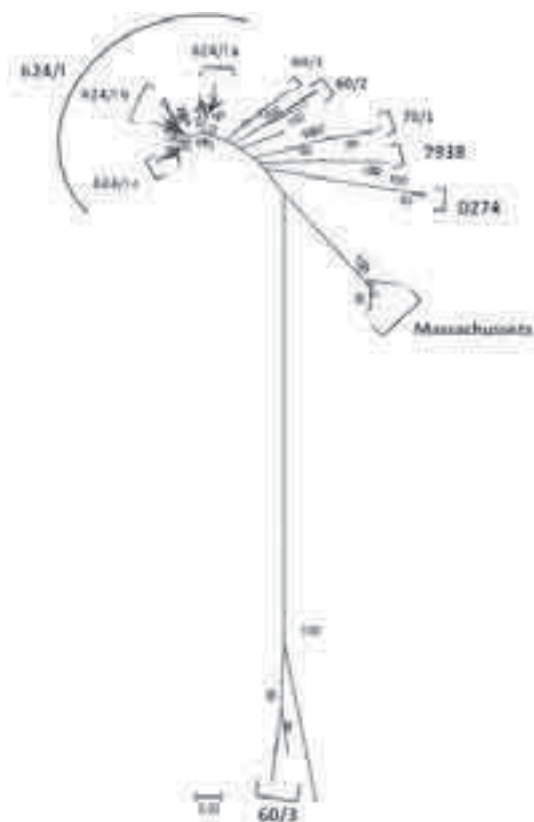
Le sequenze di genotipi di riferimento o di ceppi varianti circolanti negli anni inclusi nell'analisi sono: 624/I (JQ901492), 3794/83 FO; AZ23/74; 1731/65PV; D274 (X15832); 793B (AF093794); H120 (M21970); M41 (AY561712); PA/1220/ (AY789942).

## RISULTATI

Dei 123 ceppi in analisi, 122 ceppi sono stati amplificati mediante RT-PCR con primer universali mentre 1 ceppo isolato nel 1979 è stato amplificato con primer specifici per il genotipo D1466. Tale amplificato, sottoposto a sequenziamento, è stato confermato appartenere al genotipo D1466 con similarità nucleotidica del 98% con il ceppo di riferimento (Accession Number: M211971).

L'analisi filogenetica mediante metodo neighbour joining è stata condotta sui 122 amplificati di 382 bp ottenuti con primer universali per il gene S1 di IBV.

Le sequenze si raggruppano in 8 differenti cluster, 4 dei quali corrispondenti ai genotipi circolanti durante gli anni in analisi (Figura 1): 624/I, 793B, D274, Massachusetts.



**Figura 1.** Albero filogenetico costruito con il metodo neighbour-joining analizzando tutte le sequenze nucleotidiche parziali del gene S1 ottenute con i primer universali.

Separati rispetto a questi, vi sono altri 4 cluster qui denominati: 60/1, 60/2, 60/3, 70/1, che complessivamente raggruppano 15 ceppi. Tutti i 15 ceppi appartenenti a questi cluster mostrano identità nucleotidica con i ceppi di riferimento, o con le varianti utilizzate nel lavoro tra 61.8 e 89.5% mentre l'identità nucleotidica con le



sequenze depositate in GenBank non supera in nessun caso il 90% (82-90%).

Il genotipo 624/I è il cluster in assoluto più numeroso che raccoglie 76 dei 123 ceppi in analisi. Il cluster è suddiviso in 3 sottocluster 624/I a, 624/I b, 624/I c, che sono in correlazione con l'anno di isolamento: 1965-1978, 1975-1988; 1981-1989 rispettivamente.

Il genotipo Massachussets comprende 26 ceppi isolati durante tutto il periodo in analisi. Di questi 5 ceppi mostrano un'identità del 100% con il ceppo vaccinale H120, largamente utilizzato in quegli anni.

Due ceppi, entrambi isolati nel 1989 clusterizzano con il genotipo 793B, mostrando un'identità nucleotidica del 98,4 e 97,6% con la sequenza di riferimento.

Il cluster D274 comprende 4 ceppi isolati tra il 1981 ed il 1983 con identità di sequenza con il ceppo di riferimento compresa tra il 93,5 ed il 100%.

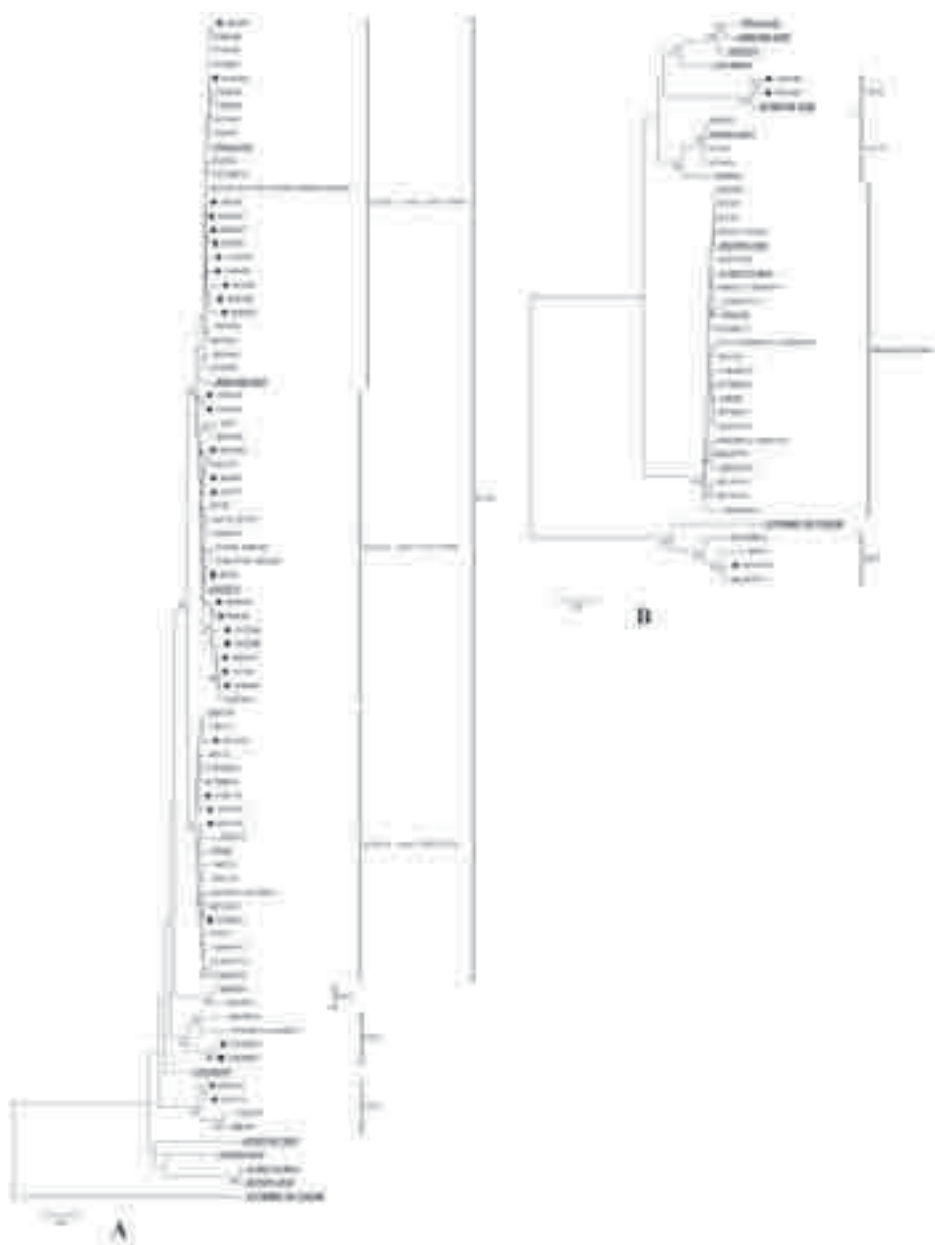
Dei 4 cluster separati dai genotipi di riferimento, 3 risultano correlati maggiormente al cluster 624/I, con una identità di sequenza rispetto ai genotipi di riferimento o le varianti incluse nell'analisi nella regione considerata che va dal 89-89,3% per il gruppo 60/1, 87,6-88% per il gruppo 60/2 e 85,5-88 per il gruppo 70/1.

Il cluster 60/3 risulta essere quello maggiormente distante filogeneticamente, i ceppi che vi appartengono sono tutti caratterizzati da un'inserzione di 3 aminoacidi in posizione 319-321. La maggiore identità con tutte le sequenze depositate in GenBank risulta essere del 82% con la variante americana PA/1220/1998, anche essa caratterizzata da una inserzione di 9 nt nella medesima posizione ma con un nt di differenza, risultante in una mutazione non sinonima (GATCTTTAT nelle sequenze analizzate nel lavoro e GATTCTTAT in PA/1220/1998).

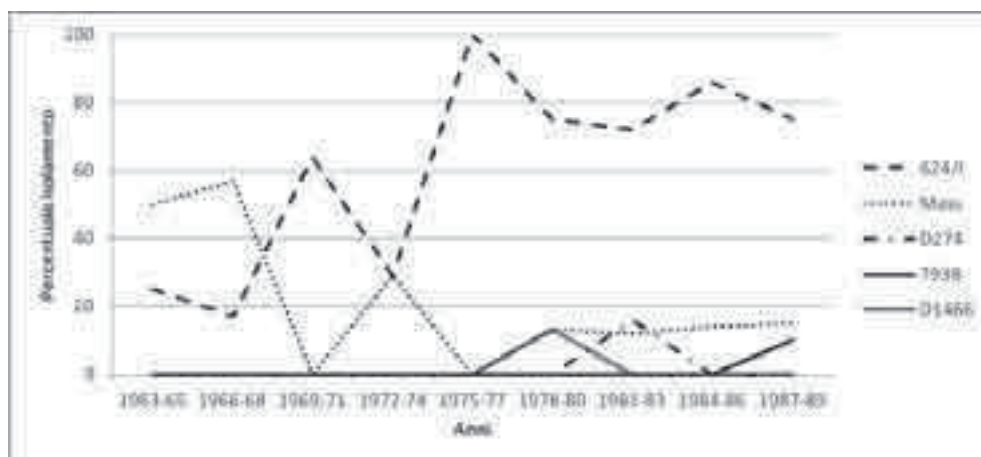
I ceppi nefropatogeni analizzati appartenevano per la maggioranza (29 di 37) al genotipo 624/I, in particolare al gruppo 624/I b di cui fa parte anche la nota variante nefropatogena AZ23/74. Vale la pena notare che i due ceppi 793B identificati erano ceppi a tropismo renale mentre nessun ceppo nefropatogeno è risultato appartenere ai genotipi Massachussets e D274.

## **DISCUSSIONE**

In questo studio sono stati analizzati 123 ceppi di IBV isolati negli anni 1963-1989. Tutti i ceppi sono stati amplificati e sequenziati in una regione parziale del gene codificante per la subunità S1 della proteina S di IBV. Tre regioni ipervariabili (HVR1, 2, 3) associate con gli epitopi neutralizzanti della subunità S1, sono state identificate e comprendono i residui aminoacidici 38-51, 99-115 e 274-387 rispettivamente (Koch et al., 1990). I primer universali utilizzati in questo studio amplificano la HVR3 mentre i primer specifici per il genotipo D1466 amplificano la regione HVR2. Da questo studio è emerso che il genotipo Massachussets era il genotipo predominante fino alla metà degli anni '60, dal quel momento in poi diventa predominante il 624/I e lo rimane fino alla fine degli anni '90 (Figura 3). Tra la fine degli anni 70 ed i successivi anni '80 sono anche stati isolati i genotipi D1466, D274 e 793B. Durante gli anni '60 e '70 è stata evidenziata la presenza di ceppi variati sul nostro territorio. La maggioranza dei ceppi analizzati clusterizzano con il genotipo 624/I, genotipo identificato e caratterizzato solo successivamente rispetto all'anno di isolamento dei ceppi in analisi in questo lavoro (Capua et al., 1994; Capua et al., 1999), ma presente in maniera massiccia già dall'inizio degli anni '60. Il cluster 624/I può essere suddiviso in 3 differenti sottocluster (624/I a, 624/I b,



**Figura 2.** Alberi filogenetici costruiti analizzando le sequenze nucleotidiche parziali del gene S1 con il metodo neighbour-joining. I ceppi di riferimento e le varianti incluse nell'analisi sono in grassetto corsivo sottolineato. Tutti i ceppi nefropatogeni sono indicati con un rombo nero. Sono riportati solamente i valori di bootstrap >70. **A.** Genotipo 624/I e cluster 60/1, 60/2, 70/1. **B.** Genotipi 793B, D274, Massachussets e cluster 60/3.



**Figura 3.** Andamento della percentuale di isolamento dei genotipi 624/I, Massachussets, D274, 793/B e D1466.

624/I c). Risulta infatti che le sequenze dei ceppi isolati negli anni 1965-1978 differiscono da quelle isolate negli anni 1975-1988 e da quelle isolate tra gli anni 1981-1989 formando così 3 gruppi chiaramente separati, ad indicare una variazione del genotipo negli anni. I ceppi varianti caratterizzati da Zanella e Pascucci AZ23/74 e 3794/83FO appartengono al secondo ed al terzo cluster rispettivamente, mentre il ceppo di riferimento del genotipo 624/I appartiene al terzo gruppo. Tale dato è in accordo con gli isolamenti del ceppo nefropatogeno AZ23/74 già segnalati per i 25 anni successivi alla sua descrizione, associati a gravi perdite, in particolare all'allevamento dei broilers (Zanella et al., 2003)

Due ceppi appartenenti al genotipo 624/I (37/1969 FO e 307/69FO), ed in particolare al sottocluster 624/i-a, erano stati precedentemente analizzati nelle loro caratteristiche antigeniche (Rinaldi et al., 1970) ed erano risultati tra loro simili ma non correlabili a sierotipi classici utilizzati per l'analisi effettuata al tempo (Massachussets, Connecticut, Iowa, Holte, Gray, JMK, Australia T, IBV-10, IBV – K4), dato che conferma la nostra caratterizzazione genotipica.

Tre cluster, qui nominati 60/1, 60/2 e 70/1, insieme alla variante 1731/65PV si separano dal cluster 624/I. L'identità nucleotidica tra i ceppi ad essi appartenenti ed il genotipo 624/i è compresa nel range 82,6-88,2%, del tutto paragonabile all'identità di sequenza rilevata nella medesima zona sequenziata anche tra ceppi di riferimento di genotipi differenti: il ceppo 793/B condivide l'89,3% di identità con IT02 e l'86,9% con il genotipo B1648 nelle 382bp analizzate. Tutti i ceppi dei primi due cluster sono stati isolati durante gli anni '60, mentre tutti quelli del terzo sono stati isolati negli anni '70. La separazione genotipica è confermata, anche in questo caso dall'analisi antigenica di due ceppi (215/1969 PV e 216/1969 PV), risultati appartenere al cluster 60/2. Questi due ceppi erano anch'essi già stati studiati da Rinaldi et al., (1970) e risultati simili tra loro, non correlabili a sierotipi classici e differenti anche dai ceppi 37/1969 FO e 307/69FOP. Anche in questo caso, quindi il

dato genotipico da noi ottenuto rispecchia le caratteristiche dei ceppi anche dal punto di vista antigenico.

Anche il ceppo variante 1731/65PV risulta antigenicamente differente dai ceppi AZ23/74 e 3794/83FO, mentre risulta interessante notare che il ceppo 3794/83FO viene neutralizzato completamente dall'antisiero del ceppo nefropatogeno AZ23/74 (Zanella, 1976), anche se l'antisiero 3794/83FO non neutralizza il ceppo AZ23 con titolo significativo, dato da sottoporre ad approfondimento (Pascucci et al., 1986a). Il genotipo Massachussets è quello, insieme al 624/I che viene isolato durante tutto il corso del periodo in esame. Bisogna ricordare che negli anni '60 vi fu applicazione generalizzata della vaccinazione con sierotipo Massachussets e che 5 ceppi isolati negli anni '80 sono risultati 100% identici al ceppo vaccinale H120, largamente utilizzato in quegli anni (Pascucci et al., 1986a).

Il genotipo D1466 viene evidenziato per la prima volta nel 1979 mentre il genotipo D274 è stato rilevato nel 1981 e viene rilevato solo fino al 1983. Entrambe le date sono precedenti alle prime segnalazioni presenti in bibliografia. Probabilmente, infatti, questi genotipi rimangono presenti a basse percentuali negli anni seguenti, come descritto da Pascucci et al. 1986b, che riportava i primi isolamenti dei due ceppi nel 1985 e che osservava però come la sieroconversione verso queste varianti fosse in quegli anni estremamente diffusa negli allevamenti.

Il nostro risulta anche il primo rilevamento del genotipo 793/B in Italia, che diventa uno dei maggiori componenti della popolazione di IBV nel nostro paese durante gli anni '90 (Capua et al., 1999). I due ceppi isolati nel 1989 hanno mostrato un'identità nucleotidica del 98,4 e 97,6 con la sequenza 793/B di riferimento ed in entrambi i casi, un tropismo renale.

Il cluster 60/3 è quello che in assoluto si discosta maggiormente da tutti gli altri. Il ceppo 187/1967 PV che vi appartiene era stato precedentemente analizzato (Rinaldi et al., 1970). In quello studio, gli autori conclusero che si trattava di un ceppo di incerta classificazione, pur essendo stato isolato da episodio di nefrite-nefrosi, in quanto presentava caratteristiche diverse dai virus di IBV fino ad allora considerati: più elevata sensibilità a pH acido e maggiore termoresistenza con stabilizzazione in presenza di cationi bivalenti, mentre l'infezione sperimentale di pulcini SPF aveva prodotto solo una lieve sintomatologia respiratoria. Queste caratteristiche fanno concludere agli autori che il ceppo meritava ulteriori approfondimenti, dal nostro studio emerge che tutti i ceppi appartenenti a questo cluster mostrano come maggiore caratteristica distintiva, una inserzione di 3 aminoacidi nella subunità S1.

Il genotipo 624/I presenta il 38% di ceppi nefropatogeni al suo interno, non sono presenti ceppi nefropatogeni tra quelli di genotipo Massachussets e 624/I, mentre entrambi i ceppi 793B presentano tropismo renale.

## CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato evidenziato come durante gli anni in analisi i genotipi Massachussets e 624/I fossero i più diffusi. In particolare il genotipo Massachussets risulta il genotipo isolato con maggiore frequenza fino alla metà degli anni '60, mentre negli anni successivi è il genotipo 624/I quello che appare a maggiore diffusione. L'analisi molecolare ha anche permesso di evidenziare come questo genotipo abbia subito modificazione nel corso del periodo temporale analizzato. Sono poi stati isolati i genotipi D1466, D274 e 793B negli anni 1979, 1981 e

1989, rispettivamente. In tutti casi la presenza di questi genotipi è stata dimostrata antecedente alle segnalazioni presenti in bibliografia. E' stata poi dimostrata la presenza negli anni '60 e '70 di diverse varianti genotipiche alcune delle quali già classificate come varianti antigeniche negli anni in cui erano state isolate.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Cook JK. 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol.*;13(4):733-41.
2. Cook JK, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB. 1996. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *Vet Rec.*;138(8):178-80.
3. Cavanagh D, Davis PJ. 1993. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the U.K. *Arch Virol.* 130(3-4):471-6.
4. Cavanagh D., Mawditt K., Gough R., Picault J.P. Britton P. 1998. Sequence analysis of strains of the 793/B genotype (CR88, 4/91) of IBV isolate between 1985 and 1997. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.) *Proceedings of an International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infectious in Poultry* (pp. 252-256). Giessen: Justus Liebig University.
5. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 28:593-605.
6. Capua I, Gough RE, Mancini M, Casaccia C, Weiss C. 1994. A 'novel' infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41(2):83-9.
7. Capua I., Z. Minta, E. Karpinska, Karen Mawditt, P. Britton, D. Cavanagh & R. E. Gough. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian pathol.*: 28, 587-592.
8. Develaar F.G., Kouwenhoven B., Burger A.G. 1984. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler productions in The Netherlands. *The Veterinary Quaterly*, 6:114-120.
9. Gough RE, Randall CJ, Dagless M, Alexander DJ, Cox WJ, Pearson D. A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet Rec.*;130(22):493-4.
10. Koch G, Hartog L, Kant A, van Roozelaar DJ. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J Gen Virol.*; 71:1929-35.
11. Parsons D, Ellis MM, Cavanagh D, Cook JK. 1992. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Vet Rec.*;131(18):408-11.

12. Pascucci S., Cordioli P., Giovannetti L. 1986a. Caratterizzazione di un ceppo variante della bronchite infettiva. *La Clinica Veterinaria*, 109 (1):55-58.
13. Pascucci S., Cordioli P., Giovannetti L., Franciosi C. 1986b. Studi sierologici su ceppi del virus della bronchite infettiva isolati in Italia negli anni 1984-1985. *La Clinica veterinaria* 109 (1): 59-61
14. Pascucci S., Franciosi C., 1990. Epidemiologia della Bronchite Infettiva in Italia. *Zootecnica International*: 18-23.
15. Rinaldi A., Crespi A., Cervio G., Mandelli G. 1966. Isolamento di un ceppo nefropatogeno del IBV del pollo. *Selezione Veterinaria*, 7; 284-289.
16. Rinaldi A., Mandelli G., Pascucci S., Cervio G., Valeri A. 1970. Caratteristiche di alcuni virus isolati in Italia da malattie respiratorie del pollo. *Atti del IX° Convegno di patologia aviare*. Varese, 30 maggio - 2 giugno 1970.
17. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.*; 28(10):2731-9.
18. Zanella A. 1976. Bronchite Infettiva nei polli da carne con particolare riferimento alle forme di nefrite-nefrosi. *Atti XV Convegno di Patologia aviare*. Sirmione, 1976.
19. Zanella, A., Lavazza, A., Marchi, R., Moreno Martin, A. and Paganelli, F. 2003. Avian infectious bronchitis: characterization of new isolates from Italy. *Avian Diseases*, 47: 180–185.

## **TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* CIRCOLANTI IN ITALIA TRA IL 2010 ED IL 2012**

Taddei R.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>, Barbieri I.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

*1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
Sezione Diagnostica di Forlì, Via Marchini, 1 - 47100 Forlì.*

*2 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
Reparto di Genomica - Sede di Brescia, via Bianchi, 9 - 25124 Brescia.*

### **Summary**

Sixtyseven *Mycoplasma gallisepticum* (MG) isolates from Italy were analyzed by molecular methods. The strains were isolated from 2010 to 2012, each one from a different farm.

PCR and PCR RealTime protocols were carried out in order to differentiate MG field strains from the live vaccine strains ts-11 and 6/85. The genetic diversity of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region was also investigated.

### **INTRODUZIONE**

*Mycoplasma gallisepticum* (MG), patogeno a diffusione mondiale, è sicuramente il micoplasma le cui infezioni causano le maggiori ricadute sull'allevamento avicolo. L'infezione da MG mostra un'ampia varietà di manifestazioni cliniche, variando da infezioni asintomatiche fino a patologie respiratorie croniche con l'interessamento di patogeni secondari (*Escherichia coli*, virus della Bronchite Infettiva Aviare, virus della Malattia di Newcastle) e cospicue perdite economiche dovute principalmente alla gestione delle carcasse, all'aumento dei costi per l'impiego di farmaci ed alla riduzione della produzione e della qualità delle uova. All'interno della specie MG è stata descritta una marcata eterogeneità in rapporto alle proprietà biologiche, tropismo tissutale, virulenza e patogenicità. Attualmente, l'efficacia del controllo da infezione dell'MG si basa da una parte sul mantenimento dei gruppi di riproduttori micoplasma-free insieme all'applicazione di rigorose misure di biosicurezza e dall'altro sull'utilizzo di programmi vaccinali. Nel nostro paese vengono attualmente utilizzati 2 vaccini vivi: il vaccino 6/85 (Merial SAS), originato da un ceppo virulento americano attenuato mediante passaggi seriali (Evans & Hafez, 1992) ed il vaccino ts-11 (Intervet International BV), originato da un ceppo virulento australiano mediante mutagenesi chimica (Whithear et al., 1990). L'utilizzo di vaccini, in aumento negli ultimi anni, ha determinato la necessità di differenziare rapidamente i ceppi di campo dai ceppi vaccinali per una corretta diagnosi della patologia. La rapida identificazione dell'infezione da MG e la diversificazione tra i differenti ceppi di campo è essenziale allo scopo di monitorare efficacemente i focolai, identificare la sorgente di infezione ed improntare efficaci strategie di controllo. Negli ultimi anni stati messi a punto dei protocolli di PCR (Evans et al., 2008) e PCR RealTime (Raviv et al., 2008) per differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di MG utilizzati per prove sperimentali in vivo (ceppi S6, R, Rlow), la cui efficacia sui ceppi di campo non è del tutto nota.

I metodi di sequenziamento di un gene target sono stati recentemente introdotti per gli studi di epidemiologia molecolare. In particolare, per la tipizzazione molecolare di MG sono stati studiati il gene *pvpA* (Boguslavsky et al., 2000; Liu et al., 2001), *gapA* (Goh

et al., 1998; Keeler et al., 1996), *mgc2* (Hnatow et al., 1998) e la regione 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence (IGSR) (Raviv et al., 2007).

Obiettivo di questo lavoro è testare i protocolli di PCR e PCR RealTime già sviluppati per differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di MG utilizzati per prove sperimentali in vivo, su campioni di campo raccolti su tutto il territorio nazionale oltre ad indagare la variabilità a livello molecolare dei ceppi di MG mediante sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Sono stati inclusi in questa analisi 67 ceppi di MG isolati da 67 allevamenti diversi collocati in 13 regioni italiane dislocate sull'intero territorio nazionale. Cinque ceppi sono stati isolati nell'anno 2010, 21 nel 2011, e 41 nel 2012. I ceppi provenivano in larga parte da polli (62), ma anche da tacchini (2), fagiani (1), pernici (1) e starne (1). Gli allevamenti di provenienza comprendevano: riproduttori pesanti (6), broiler (19), ovaiole (35), pollastre (2). I campioni conferiti sottoposti ad analisi comprendono animali vivi con segni clinici, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali.

Per la maggior parte dei campioni inclusi nell'analisi era noto lo stato anamnestico ed il piano vaccinale eventualmente effettuato nell'allevamento di provenienza.

### *Identificazione molecolare di MG*

I campioni di organo ed i tamponi identificati come positivi per la presenza di MG mediante PCR (OIE, 2008), sono stati sottoposti ad ulteriori indagini molecolari. In particolare, l'estratto di DNA ottenuto mediante DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) seguendo le indicazioni della ditta produttrice è stato sottoposto alle seguenti reazioni PCR e sequenziamento:

#### *• PCR end-point per l'identificazione dei ceppi vaccinali*

E' stata utilizzata una coppia di primer disegnata sulla sequenza del gene *gapA* (PRUMG32-F/PRUMG36-R – Tabella 1) che amplifica un frammento specifico di 108bp (Evans et al., 2008). In particolare, in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 0.5µM di ogni primer, 12.5µl di Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2X (GoTaq Hot Start Colorless master Mix – Promega) e 5µl di estratto di DNA. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C, 2 min), 40 X (95°C, 45 sec; 62,5°C, 30sec, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 5 min).

PCR real-time per l'identificazione dei ceppi vaccinali

Sono state effettuate due differenti reazioni di PCR RealTime con sonde Taqman per l'identificazione dei due vaccini 6/85 e ts-11 (Raviv et al., 2008). Le due reazioni sono ognuna disegnata su un differente ceppo vaccinale e vengono effettuate in due diversi pozzetti con identica mix di reazione (ad eccezione del primer reverse) ed identico profilo di amplificazione.

Le mix di reazione sono allestite in 25µl totali contenenti: 0.5µM di ogni primer (Tabella 1), 0,05µM di sonda, 12,5µl di Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems) e 5 µl di DNA estratto. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C, 10 min), 40 X (95°C, 15 sec; 61°C, 1 min).

#### *• Sequenziamento della regione 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence ed analisi filogenetica*

E' stata amplificata la regione 16S-23S rRNA IGSR e l'amplificato di 812 bp ottenuto è



stato sottoposto a sequenziamento (Raviv et al., 2007). In particolare, in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 0.5µM di ogni primer (MGIGSR F / MGIGSR R, tabella 1), 12.5µl di Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2X (GoTaq Hot Start Colorless master Mix – Promega) e 5µl di estratto di DNA. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C, 2 min), 35 X (95°C, 45 sec; 55°C, 30sec, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 5 min). Le reazioni di sequenza sono state approntate a partire dal prodotto PCR previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit – QIAGEN®) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem®) secondo le istruzioni del produttore, in entrambe le direzioni, impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione. Le reazioni di sequenza sono state sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga 3130 (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v7.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA). L'analisi filogenetica è stata eseguita su tutti gli amplificati ottenuti, con metodo Neighbour-joining utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011). Il valore di bootstrap considerato nell'analisi, per associare un valore di affidabilità ai rami dell'albero, è di 1000 replicati.

**Tabella 1.** Sequenza dei primer e probe utilizzati in PCR e PCR RealTime.

Target	Primer/probe	Sequenza	Gene target
ts-11 / 6/85	PRUMG32-F	gaactgattttggaagcgttaaga	<i>gapA</i>
	PRUMG36-R	ccgttatatcatcctgaatctct	
ts-11	<i>mgc2</i> F	ctcaagaaccaactcaacca	<i>mgc2</i>
	<i>mgc2_ts-11</i> R	ggggattaggaataaattgcggat	
	<i>mgc2</i> P	[FAM]cagccaggatttaacacactcag [BHQ]	
6/85	<i>mgc2</i> F	ctcaagaaccaactcaacca	<i>mgc2</i>
	<i>mgc2_6/85</i> R	ggatgaggaccaaatgcggat	
	<i>mgc2</i> P	[FAM]cagccaggatttaacacactcag[BHQ]	
MG	MGIGSR F	gtaggccgggtgattggagtta	16S-23S rRNA IGSR
	MGIGSR R	cccgtagcatttcgaggtttg	

## RISULTATI

La PCR end-point per l'identificazione dei ceppi vaccinali è risultata positiva in 19 dei 30 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con uno dei due vaccini commerciali e in 4 dei 37 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati (Tabella 2).

La PCR RealTime per l'identificazione del ceppo vaccinale 6/85 è risultata positiva in 7 di 7 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85, in 28 di 37 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati e in 10 di 23 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con ts-11.

La PCR RealTime per l'identificazione del ceppo vaccinale ts-11 è risultata positiva in 22 di 23 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con ts-11, 28 di 37 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati e 3 di 7 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85.

L'analisi filogenetica con il metodo neighbour-joining delle sequenze della regione 16S-23S rRNA IGSR, ha evidenziato la presenza di 6 cluster nominati Cluster I, II, III, IV, V, VI

(Figura 1). I cluster II e III comprendono i ceppi del vaccino ts-11 e 6/85 rispettivamente. In tabella 2 viene riportata la suddivisione per cluster e per provenienza geografica dei ceppi inclusi nell'analisi.

In tabella 3 sono raccolti i dati ottenuti sui campioni suddivisi per stato vaccinale dell'allevamento di provenienza, della PCR end-point e del sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR.

Quattordici di 23 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con ts-11 sono risultati positivi alla PCR per ceppi vaccinali, di questi nell'analisi di sequenziamento 13 hanno mostrato 100% di identità con il ceppo vaccinale ts-11 ed 1 il 100% di identità con il ceppo 6/85.

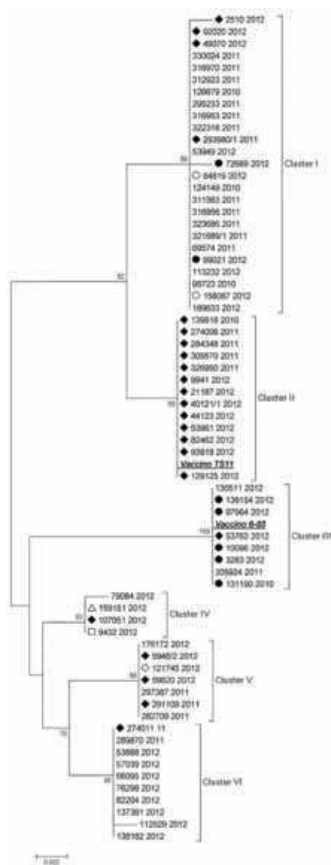


Figura 1. Albero filogenetico costruito analizzando le sequenze nucleotidiche della regione 16S-23S rRNA IGSR con il metodo neighbour-joining. I ceppi vaccinali sono riportate in grassetto corsivo sottolineato. I ceppi provenienti da allevamenti vaccinati con ts11 sono preceduti da un rombo nero, i ceppi provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85 sono preceduti da un cerchio nero, i ceppi isolati da tacchino sono preceduti da un cerchio bianco, il ceppo isolato da tacchino è preceduto da un quadrato bianco, il ceppo isolato da starna è preceduto da un triangolo bianco, il ceppo isolato da fagiano è preceduto da un rombo bianco. Sono riportati solamente i valori di bootstrap >70.

**Tabella 2.** Distribuzione geografica dei ceppi di MG suddivisi per cluster inclusi nell'analisi.

Regione	C I	C II	C III	C IV	C V	C VI	N° isolati
<b>Abruzzo</b>	1						1
<b>Calabria</b>		1					1
<b>Campania</b>	1	1					2
<b>Emilia Romagna</b>	10	2	4	1	4	3	24
<b>Lazio</b>	1	2		1		3	7
<b>Lombardia</b>	2	2	1			1	6
<b>Marche</b>	3	3	1		1	2	10
<b>Molise</b>				1			1
<b>Puglia</b>	1						1
<b>Sardegna</b>					1		1
<b>Sicilia</b>			1	1			2
<b>Umbria</b>	1						1
<b>Veneto</b>	5	2	1		1	1	10
<b>TOTALE</b>	25	13	8	4	7	10	67

I 9 campioni risultati negativi alla PCR e con identità di sequenza con il ceppo vaccinale ts-11 diversa dal 100% (compresa tra il 98-99,3%) ed il campione risultato positivo in PCR e con il 100% di identità con il ceppo 6/85 sono tutti provenienti da allevamenti in cui i dati anamnestici o le indagini sierologiche effettuate, erano del tutto compatibili con la presenza di un ceppo di campo. Allo stesso modo, anche i 2 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85 e risultati con identità diversa dal 100% con il ceppo vaccinale (97,5- 97,6% identità con il ceppo 6/85) sono ipotizzabili essere ceppi di campo sulla base delle informazioni anamnestiche dell'allevamento di provenienza.

Dei 4 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati e risultati positivi in PCR per i ceppi vaccinali, 2 sono risultati avere 100% di identità con il ceppo 6/85.

**Tabella 3.** Risultati complessivi della PCR end point per l'identificazione dei ceppi vaccinali ed il sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR.

Stato vaccinale	Totali	PCR end-point		Sequenziamento	
		Positivo	Negativo	Identità 100% 6/85	Identità 100% ts11
<b>Vaccinati ts11</b>	23	14	9*	1*	13
<b>Vaccinati 6/85</b>	7	5	2*	5	/
<b>Non vaccinati</b>	37	4	33	2	/

\* Riferibili a ceppi di campo

Considerando i ceppi di campo come quelli isolati da allevamenti non vaccinati e quelli isolati da allevamenti in cui erano state fatte vaccinazioni ma assimilabili a ceppi di campo per i dati anamnestici, il tasso dei falsi positivi della PCR end-point è risultato essere 0,1. Tale valore si conferma anche nel caso in cui si limiti l'analisi ai soli ceppi isolati da allevamenti non sottoposti a vaccinazione.

## DISCUSSIONE

In questo studio, tecniche molecolari di PCR, PCR RealTime e sequenziamento di un gene target sono state utilizzate per il differenziamento dei ceppi vaccinali 6/85 e ts-11 dai ceppi di campo, oltre che per indagare la variabilità genetica dei ceppi di MG isolati sul territorio nazionale.

Protocolli di PCR end-point e PCR RealTime messi a punto per differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi maggiormente utilizzati negli esperimenti di infezione sperimentale (R, Rlow, S6) sono stati testati su ceppi di campo e su campioni isolati da allevamenti sottoposti a vaccinazione.

Gli stessi campioni sono anche stati sottoposti a sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR (Raviv et al., 2007), sequenza che si è dimostrata essere altamente variabile nei ceppi di campo (con indice di discriminazione maggiore rispetto agli altri geni di MG utilizzati per la tipizzazione molecolare *gapA*, *mgc2* e *pvpA*).

I due protocolli di PCR RealTime testati non si sono rivelati efficaci nel differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo, il protocollo di PCR end-point ha mostrato un tasso di falsi positivi del 10%. Tre ceppi di campo (1 isolato da allevamento vaccinato con ts-11 e 2 isolati da allevamenti non sottoposti a vaccinazione) sono risultati positivi alla PCR end-point e con identità del 100% con ceppo vaccinale 6/85. Era già stata segnalata la presenza di ceppi di campo con identità del 100% con il ceppo vaccinale nella sequenza 16S-23S rRNA IGSR (Raviv et al., 2007), così come era stata riportata la positività della PCR end-point data da ceppi geneticamente molto simili al vaccino 6/85 (Evans et al., 2008). D'altra parte, è stato dimostrato come entrambi i vaccini ts-11 e 6/85 abbiano un potenziale molto basso di trasmissione da individuo ad individuo (Ley et al., 1997), anche se l'isolamento di un ceppo 6/85-like da polli non vaccinati (Steinlage et al., 2003), ha già fatto ipotizzare in passato la possibilità di una trasmissione del ceppo vaccinale da polli vaccinati ad animali non vaccinati. Nel nostro caso, non sono stati individuati nelle vicinanze degli allevamenti in cui i 3 ceppi sono stati isolati, allevamenti in cui il vaccino 6/85 venisse utilizzato, ma ulteriori studi molecolari su questi ceppi potrebbero chiarire meglio la loro possibile provenienza.

Due ulteriori campioni di campo sono risultati positivi alla PCR. I due ceppi erano diversi tra loro nella regione sequenziata e mostravano una identità di sequenza calcolata verso i due ceppi vaccinali del 93,3 verso ts-11 (Cluster I) e 98,4 verso 6/85 (Cluster IV), rispettivamente.

Dato il tasso di risultati falsi positivi osservati, questo test può essere utilizzato sui campioni di campo come test preliminare di screening, da abbinare ad altre tecniche di tipizzazione.

L'analisi filogenetica effettuata con metodo neighbour joining ha suddiviso i ceppi analizzati in 5 cluster, non si nota una clusterizzazione su base geografica, né sulla base della specie di isolamento.

A differenza di quanto osservato nel sequenziamento del gene *mgc2* (Raviv et al.,

2007), nel nostro studio nessun ceppo di campo ha mostrato una identità del 100% con il ceppo vaccinale ts-11.

Undici ceppi isolati da allevamenti vaccinati non hanno mostrato identità del 100% con i ceppi vaccinali e sono risultati negativi alla PCR end-point per l'identificazione dei ceppi 6/85 e ts-11. In tutti i casi le sequenze analizzate hanno mostrato almeno 5 mutazioni nella sequenza analizzata. La stabilità del gene osservata nei ceppi ts-11 e 6/85 (Raviv et al., 2007) insieme alla conclusione degli autori che anche solo una differenza in una base implica un differenziamento tra isolati, oltre che i risultati negativi sugli stessi ceppi ottenuti con la PCR end-point ed i dati anamnestici raccolti negli allevamenti di provenienza, ci fanno ipotizzare trattarsi in tutti i casi di ceppi di campo.

In conclusione, l'abbinamento della PCR end-point con il sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR, si è dimostrato un utile strumento per la tipizzazione molecolare di MG e per la distinzione del ceppo di campo dai ceppi vaccinali.

## **RINGRAZIAMENTI**

Questo lavoro è stato realizzato con fondi del Ministero della Salute, Progetto di Ricerca Corrente anno 2010 (IZSLER 2010008).

## **BIBLIOGRAFIA**

Boguslavsky S, Menaker D, Lysnyansky I, Liu T, Levisohn S, Rosengarten R, García M, Yogev D. 2000. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infect Immun.*;68(7):3956-64.

Evans RD, Hafez YS. 1992. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Dis.*; 36(2):197-201.

Evans JD, Leigh SA. 2008. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. *Avian Dis.*;52(3):491-7.

Goh MS, Gorton TS, Forsyth MH, Troy KE, Geary SJ. 1998. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA). *Microbiology.*;144:2971-8.

Hnatow LL, Keeler CL Jr, Tessmer LL, Czymmek K, Dohms JE. 1998. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun.*;66(7):3436-42.

Keeler CL Jr, Hnatow LL, Whetzel PL, Dohms JE. 1996. Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (mgc1) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun.* 1996;64(5):1541-7.

Ley DH, McLaren JM, Miles AM, Barnes HJ, Miller SH, Franz G. 1997. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.*;41(1):187-94.

Liu T, García M, Levisohn S, Yogev D, Kleven SH. 2001. Molecular variability of the adhesin-encoding gene pvpA among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.*;39(5):1882-8.

OIE Terrestrial Manual. 2008. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*,

- M. synoviae*). Chapter 2.3.5: pp 482-496.
- Raviv Z, Callison S, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. 2007. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Dis.*;51(2):555-60.
- Raviv Z, Callison SA, Ferguson-Noel N, Kleven SH. 2008. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Vet Microbiol.*;129(1-2):179-87.
- Steinlage SJ, Ferguson N, Sander JE, García M, Subramanian S, Leiting VA, Kleven SH. 2003. Isolation and characterization of a 6/85-like *Mycoplasma gallisepticum* from commercial laying hens. *Avian Dis.*;47(2):499-505.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.*; 28(10):2731-9.
- Whithear KG, Soeripto, Harringan KE, Ghiocas E. 1990. Safety of temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J.*;67(5):159-65.

## **DESCRIZIONE DI FOCOLAI DI BRONCHITE INFETTIVA SOSTENUTA DAL CEPPQ Q1 RECENTEMENTE SEGNALATO IN ITALIA.**

Toffan A., Bonci M., Bano L., Valastro V., Vascellari M., Capua I. & Terregino C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padova*

### **Summary**

The diagnostic and clinical observations of an infectious bronchitis virus variant referred to as Q1 from clinically ill chickens is described in this paper. This IBV variant caused a small scale epidemic in non-vaccinated meat chickens in farms located in Northern Italy in summer-autumn 2011. The disease was characterized by increased mortality, kidney lesions and proventriculitis. Phylogenetic analysis revealed that all the IBV isolates were very similar and probably had a common origin. The IBV Q1 variant appears to be now endemic in the North of Italy, and it is detected, even if not frequently, from vaccinated backyard and commercial broiler farms. Further monitoring of the spread of this IB strain in Italy and of the efficacy of vaccination in controlling this variant will be required.

### **INTRODUZIONE**

Il virus della bronchite infettiva aviaria (IBV) è conosciuto per la sua notevole capacità di modificarsi, sia per fenomeni di mutazione che di riassortimento, riuscendo così ad evadere la risposta immunitaria dell'ospite. Nuove varianti di IBV vengono frequentemente individuate, ma non tutte hanno la capacità di diffondersi e causare malattia clinica negli allevamenti avicoli (De Witt et al., 2011)

Lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere quanto osservato durante i focolai di bronchite infettiva sostenuta dal ceppo Q1 recentemente segnalato in Italia (Toffan et al., 2011).

### **MATERIALI E METODI**

Tra luglio e settembre 2011, in alcuni (n=7) allevamenti di polli da carne (Hubbard naked neck) destinati al mercato rurale, è stato osservato un insolito aumento della mortalità (4,1-9,8%), preceduto da sintomatologia respiratoria caratterizzata da rantoli e scolo nasale. Gli animali (n=83) conferiti al laboratorio per l'esecuzione di esami batteriologici, virologici, istologici e sierologici non erano stati vaccinati per la bronchite infettiva aviaria.

### **RISULTATI**

All'esame anatomopatologico si è osservato congestione ed edema polmonare, tracheite catarrale ed aerosacculite fibrinosa. I reni erano pallidi e globosi con depositi di urati intraparenchimatosi e, nei casi più gravi, sulle sierose viscerali. Anche l'apparato gastroenterico risultava coinvolto con inspessimento del proventricolo e congestione dello sbocco ghiandolare.

L'esame batteriologico eseguito dal pericardio e dai sacchi aerei ha portato all'isolamento di *E. coli* in purezza ad elevata carica mentre la ricerca di *M.*

*gallisepticum* e *M. synoviae* tramite PCR ha dato esito negativo in tutti i campioni analizzati (tamponi tracheali e sacchi aerei). Le analisi virologiche (PCR, isolamento virale in uova embrionate e su coltura cellulare) hanno permesso di escludere la presenza dei principali patogeni virali aviari (AI, NDV, IBD) ed hanno portato all'identificazione e all'isolamento di IBV in tutti gli allevamenti colpiti. L'analisi di sequenza ha evidenziato una elevata omologia (99,2-100%) alla variante IBV Q1. L'analisi filogenetica ha caratterizzato i virus isolati dai diversi allevamenti come appartenenti ad un unico cluster.

I campioni di siero hanno evidenziato la presenza di anticorpi anti IBV ad alto titolo, ed in particolare il titolo anticorpale nei confronti dell'antigene omologo (Q1) era da 2 a 4 logaritmi superiore al titolo delle altre varianti testate (M41, IT02, 793B, QX, D274, 624/I).

## **DISCUSSIONE & CONCLUSIONI**

La variante Q1 del virus della bronchite infettiva aviaria è stata descritta per la prima volta in Cina nel 1998 (Yu et al., 2001) e non è mai stata descritta al di fuori del continente asiatico. Secondo quanto riportato da Yu e colleghi nel 2001 gli animali infettati da questo virus (broiler e ovaiole) mostravano una forma clinica molto simile a quella osservata nel 2011 in Italia ovvero: depressione, diarrea, difficoltà respiratorie e proventricolite. I dati riportati in lavori successivi (Liu et al., 2009; Ababneh et al., 2012; Han et al., 2012) sulla presenza o meno delle lesioni al proventricolo in animali infetti dalla stessa variante di IBV sono però contrastanti. Sono quindi necessari ulteriori studi per approfondire il reale ruolo dell'IBV nella genesi di questa lesione.

L'indagine epidemiologica, svolta a seguito del primo isolamento di IBV Q1 in Italia, ha evidenziato che tutti i gruppi colpiti provenivano da un unico incubatoio situato in Piemonte. In concomitanza con la comparsa di questa variante di bronchite infettiva negli allevamenti, in incubatoio, per scelta aziendale, era stata sospesa la routinaria vaccinazione per IBV (con il ceppo H120), fatto che ha certamente contribuito ad aggravare la forma clinica osservata negli allevamenti colpiti. Una partita di uova proveniente dalla Francia e incubata contemporaneamente al primo gruppo colpito, è stata sospettata quale fonte d'introduzione del ceppo Q1 in incubatoio.

L'elevata omologia genetica dei ceppi isolati e le connessioni epidemiologiche tra i vari allevamenti colpiti, che facevano capo ad un unico incubatoio, fanno ritenere che quest'ultimo sia la fonte primaria di disseminazione virale anche se non permettono di escludere che il virus possa essere stato veicolato tra i vari allevamenti dai mezzi che trasportavano il mangime e che facevano capo ad un'unica azienda mangimistica.

A seguito del ripristino in incubatoio della vaccinazione per IBV, la sintomatologia clinica in allevamento si è notevolmente ridotta, suggerendo un certo livello di cross-protezione tra il virus vaccinale usato ed la variante IBV Q1, anche se è necessario approfondire questo aspetto, in quanto questi dati contrastano con quanto riportato in letteratura (Liu et al., 2009).

A distanza di un anno dal primo isolamento, il virus IBV Q1 viene ancora sporadicamente rilevato negli allevamenti del Nord Italia (Veneto e Piemonte in particolare), seppur vaccinati contro la bronchite infettiva, suggerendo che questa variante sia diventata endemica nel nostro Paese.



## BIBLIOGRAFIA

1. Ababneh M, Dalab AE, Alsaad S, Al-Zghoul M: 2012 Presence of Infectious Bronchitis Virus Strain CK/CH/LDL/97I in the Middle East. *ISRN Vet Science*, Volume 2012, Article ID 201721, doi:10.5402/2012/201721
2. De Wit JJ, Cook JK, van der Heijden HM: 2011, Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 40: 223-235.
3. Han Z, Sun C, Yan B, et al.: 2011, A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China. *Infect Genet Evol* 11: 190-200.
4. Liu S, Zhang X, Wang Y, et al.: 2009, Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/97I strain of infectious bronchitis coronavirus. *Vet. J.* 179: 130–136.
5. Toffan, A., Terregino, C., Mazzacan, E., et al.: 2011, Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Vet Record* 169: 212-213.
6. Yu L, Jiang Y, Low S, et al: 2001, Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis* 45: 416-424.

# **INDICE DEGLI AUTORI**



Aiello R., 199  
 Asdrubali, 23  
 Augustinsky K., 204  
  
 Baldasso E., 234, 237, 297  
 Bano L., 350  
 Barbieri I., 342  
 Battanoli G., 234, 237, 293  
 Battilani, 63, 254, 262  
 Beato M.S., 199  
 Bilato D., 207, 242  
 Bonci M., 350  
 Boniotti M.B., 332  
 Borrelli L., 325  
 Bortolaia, 161  
 Bozzo G., 267  
  
 Cafiero M.A., 216  
 Camarda A., 216, 267, 314  
 Capua I., 199, 350  
 Caroli A., 212, 267, 314  
 Casadio M., 332, 342  
 Castello M.C., 226, 233  
 Castells M., 204  
 Catania S., 207, 234, 237, 240, 293, 297  
 Catelli E., 75, 207, 251, 257, 278, 282  
 Cazaban, 133  
 Cecchinato M., 243, 251, 257, 278  
 Ceglie L., 207  
 Cesari V., 5, 264  
 Circella E., 212, 216, 224, 267, 314  
  
 Dardi M., 276  
 De Canale, 187  
 De Gussem M., 276  
 De Matteo P., 243  
 Di Paola G., 216  
 Dipineto L., 325  
  
 Fabbi M., 332  
 Falchieri M., 278  
 Ferrarini, 179  
 Ferrazzi V., 264  
 Fincato A., 234, 240, 297  
 Fiorentini L., 284, 332, 342  
  
 Fioretti A., 325  
 Flaminio B., 240, 293, 297  
 Fontanella M., 325  
 François Xavier Le Gros, 141  
  
 Galazzi, 25  
 Gallazzi D., 264, 303  
 Gaspari P., 284  
 Giangaspero A., 216  
 Giardini A., 264  
 Giovanardi D., 251  
 Giurisato I., 207  
 Gobbo F., 242, 293, 297  
 Grilli G., 303  
 Guarneri P., 303  
  
 Hafez Mohamed Hafez, 56  
  
 Iob L., 234, 237, 240  
  
 Kontolaimou M., 278  
  
 Legretto M., 212, 216, 224, 267, 314  
 Lilliu E., 284  
 Listorti V., 243, 251, 257, 278  
 Lontani B., 284  
 Lozito P., 314  
 Lupini C., 243, 251, 257, 278  
  
 Mancin M., 199  
 Maniero S., 199  
 Marziali A., 243  
 Massi P., 284, 332, 342  
 Meliota F., 314  
 Menna L.F., 325  
 Mondin A., 257  
 Morandini E., 251  
 Munoz Pogoreltseva O.S., 257  
  
 Naylor C.J., 85, 243, 278  
  
 Pagès M., 276  
 Pascucci., 332  
 Pesente P., 251  
 Petrella A., 212

Piccirillo., 151  
Ponsa F., 204  
Pugliese N., 212, 216, 267, 314

Qualtieri K., 237, 293

Ricci., 171  
Rigoni M.,199  
Rodio S., 234, 237, 240  
Rossi G., 251  
Rubio J., 276  
Russo T.P., 325

Santaniello A., 325  
Santone C., 240, 297  
Schwefer S., 204  
Sperati Ruffoni L., 251

Sturaro A., 293

Taddei R., 284, 332, 342  
Terregino C., 199, 350  
Toffan A., 350  
Toschi I., 264  
Tosi G., 284, 332, 342  
Troiano P., 212

Valastro V., 350  
Vandenbussche N., 276  
Van Meirhaeghe H., 276  
Van Mullem K., 276  
Vascellari M., 350

Zanella A., 32  
Zuccarello S., 303





# Food for professionals



Huvepharma NV - Uitbreidingstraat 80 - 2600 Antwerp - Belgium  
Tel: +32 3 288 1849 - Fax: +32 3 289 7845  
e-mail: [customerservice@huvepharma.com](mailto:customerservice@huvepharma.com)  
Per l'Italia: [paolo.schiavi@huvepharma.com](mailto:paolo.schiavi@huvepharma.com)  
[www.huvepharma.com](http://www.huvepharma.com)



# For poultry safety



stream ady - www.izom.it



Veterinary Biological Specialties

When your mission is prevention, you need effective defences against poultry diseases.

With its full range of high quality vaccines, **IZO** offers all the right solutions.

Mission accomplished.



## Partner impegnati

La nostra competenza globale garantisce l'assistenza sul posto.

- Avian Vaccines
- Feed Additives
- Pharmaceutical Toll Production



 **Lohmann**  
Animal Health

L'industria della produzione animale a livello mondiale si affida ai nostri additivi zootecnici ed ai nostri vaccini avicoli di alta qualità.

La loro efficacia è segno del nostro successo. Questi risultati si ottengono attraverso soluzioni specifiche e servizi appropriati ai nostri clienti ovunque essi siano.

**Prevention First**

*Lohmann Animal Health*  
*Via Cadorna, 8/133*  
*20090 Buccinasco (MI), Italy*  
*Phone: + 39 02 45712447*  
*e-mail: office.italy@lohmnn.de*  
*Fax: + 39 02 45704683*  
[www.lohmnn.de](http://www.lohmnn.de)

MERIAL - Uno sguardo lungimirante...

*Salmonella Enteritidis*  
&  
*Salmonella Typhimurium*

chiedi consiglio al tuo Servizio Veterinario



...e le uova sono più sicure



# Curiamo i vostri animali al meglio perchè rendano al massimo.

La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali. Per questo Novartis Animal Health, società multinazionale del settore farmaceutico, è impegnata da anni a ricercare, sviluppare e commercializzare prodotti veterinari in grado di combattere le più importanti patologie degli animali da reddito ed assicurare loro un ambiente di vita più salubre.

Animali in buona salute, più rilassati, producono di più e meglio, grazie alle soluzioni terapeutiche d'avanguardia di Novartis Animal Health, sviluppate nel rispetto dei più rigidi standard di eccellenza qualitativa per garantire efficacia, tollerabilità, sicurezza, e massima resa.





INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI ANIMAL HEALTH PRODUCT



**> RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE**

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.



Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA  
INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE  
E STABILIMENTO  
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT  
Via Alfaro 4  
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:  
+39 0522 640711

FAX:  
+39 0522 649757  
+39 0522 640716

info@treivet.com  
www.treivet.com









Finito di stampare  
nel mese di ottobre 2012  
da La Ducale Srl - Parma