



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2021



LX CONVEGNO ANNUALE VI SIMPOSIO SCIENTIFICO

**Rimini (RN), 7 Settembre 2021
Bologna (BO), 19 Novembre 2021**

In copertina: **“WE SEE EYE TO EYE”** - Nicoletta Belletti
www.bellettinicoletta.it

**SOCIETÀ ITALIANA
DI
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI
della Società Italiana
di
Patologia Aviare
2021**

**Rimini (RN), 7 Settembre 2021
Bologna (BO), 19 Novembre 2021**



INDICE

Prefazione pag. 17

ATTI DEL LX CONVEGNO NAZIONALE SIPA

Rimini (RN), 7 Settembre 2021

CONVEGNO

SFIDE SANITARIE RILEVANTI PER LA MODERNA AVICOLTURA

- AGGIORNAMENTI SULL'INFLUENZA AVIARE
Calogero Terregino pag. 21
- MALATTIE VIRALI IMMUNOSOPPRESSIVE: ANCORA UNA SFIDA PER IL SETTORE AVICOLO?
Caterina Lupini pag. 23
- PIANO NAZIONALE DI CONTROLLO DELLE SALMONELLOSI NEGLI AVICOLI: PASSATO, PRESENTE E FUTURO
Veronica Cibir pag. 25
- AGGIORNAMENTI SUL RUOLO DEGLI ENTEROCOCCHI NELLE INFEZIONI DELL'APPARATO SCHELETRICO DEL POLLO DA CARNE
Luca Bano pag. 29

ATTI DEL VI SIMPOSIO SCIENTIFICO

Bologna, 19 Novembre 2021

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- RUOLO DELLE INFEZIONI DA *ESCHERICHIA COLI* NELLE PERFORMAN-
CE DI ANIMALI COMMERCIALI DELLA SPECIE *GALLUS GALLUS*
Cesca A., Siclari C., Vasumi G., Alberti S. pag. 35

- PROVE *IN VITRO* DI EFFICACIA ANTIMICROBICA DI *ALLIUM SATIVUM* NEI CONFRONTI DI SALMONELLA ENTERICA SUBSPECIE ENTERICA SEROVAR ENTERITIDIS
Casalino G., Bozzo G., D'Amico F., Camarda A., Lombardi R., Romito D., Circella E. **pag. 43**

- EFFETTI DELLE PROFILASSI ANTIMICROBICHE SUL MICROBIOTA INTESTINALE E SULLA BARRIERA INTESTINALE IN POLLI BROILER
Cuccato M., Scaglione F. E., Pregel P., Laconi A., Perona G., Nurisso S., Sereno A., Divari S., Piccirillo A., Cannizzo F. T. **pag. 51**

- DALL'EST ALL'OVEST: RICOSTRUZIONE FILODINAMICA DELLA STORIA DELLA VARIANTE 2 DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE
Franzo G., Legnardi M., Grassi L., Houta M. H., Hassan K. E., Tucciarone C. M., Abdel-Moneim A. S., El-Sawah A. A., Ali A., Cecchinato M. **pag. 59**

- EFFICACIA E SICUREZZA DI UN VACCINO VIVO PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: L'ISTOPATOLOGIA SERVE ANCORA?
Giudice C., Lupini C., Benedetti V., Quaglia G., Mescolini G., Tecilla M., Prandini F., Ortali G., Catelli E., Volorio A. **pag. 73**

- IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA SPECIE DI CIRCOVIRUS IN UN ALLOCCO (*STRIX ALUCO*) IN SUD ITALIA
Grassi L., Legnardi M., Franzo G., Menandro M. L., Tucciarone C. M., Minichino A., Dipinetto L., Fioretti A., Cecchinato M. **pag. 79**

- VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA AVIARE ED UCCELLI SELVATICI: REVISIONE SISTEMATICA E METANALISI DEI DATI SU SCALA GLOBALE
Graziosi G., Catelli E., Fanelli A., Lupini C. **pag. 85**

- STUDIO FENOTIPICO E GENOTIPICO DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLA COLISTINA DI *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA INFANTIS* ISOLATI IN POLLI DA CARNE
Musa L., Casagrande Proietti P., Stefanetti V., Toppi V., Marenzoni M. L., Shtylla Kika T., Blasi F., Branciaro R., Franciosini M. P. **pag. 93**

- CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI RIASSORTANTI DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV) CIRCOLANTI IN ITALIA
Legnardi M., Tonellato F. R., Cioffi A., Tucciarone C. M., Franzo G., Garavini G., Trevisani G., Dall'Angelo A., Cecchinato M. **pag. 101**

- EFFICACIA E SICUREZZA DI UN VACCINO VIVO PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: STUDIO DI CAMPO E ASPETTI MOLECOLARI
Lupini C., Catelli E., Giudice C., Benedetti V., Quaglia G., Mescolini G., Tecilla M., Ortali G., Prandini F., Volorio A. pag. 111
- LO STRANO CASO DI UN CEPPLO DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* CHE SFUGGE ALLA RIVELAZIONE MEDIANTE PCR *END POINT*
Matucci A., Stefani E., Gavazzi L., Tondo A., Picchi M., Cristovao Borges L., Bottinelli M., Merenda M. pag. 117
- LAMP-LFD: MESSA A PUNTO DI NUOVI PROTOCOLLI PER LA RILEVAZIONE RAPIDA, SENSIBILE E SPECIFICA DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK SIEROTIPO 1 E SIEROTIPO 2 E DELL'HERPESVIRUS DEL TACCHINO
Mescolini G., Baigent S.J., Catelli E., Nair V.K. pag. 125
- CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO NEL BACINO DEL MEDITERRANEO
Quaglia G., Mescolini G., Di Francesco A., Catelli E., Salvatore D., Prentza Z., Sakhria S., Berto G., Muccioli F., Koutoulis K., Paparounis T., Ben Chehida N., Lupini C. pag. 135
- MOLECOLE VEGETALI NELLA STIMOLAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ DI CELLULE DENDRITICHE AVIARIE
Ghiselli F., Rossi B., Piva A., Grilli E. pag. 143
- SIMULAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFETTO DELLA DILUIZIONE IN ACQUA CLORATA DI VAC-SAFE SULLA VITALITÀ DI VACCINI VIVI AVIARI
Russo E., Quaglia G., Catelli E., Lupini C. pag. 155
- CONTRIBUTO DELLA VIA ALIMENTARE ALLA CIRCOLAZIONE DEL CEPPLO PHY-LMV42 DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE IN RAPACI SELVATICI
Samarelli R., Schiavone A., Pugliese N., Circella E., Lombardi R., Siddique I., Camarda A. pag. 159
- PROFILI FENOTIPICI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI *ESCHERICHIA COLI* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATI DA VOLATILI PET
Dipineto L., Varriale L., Russo T.P., Santaniello A., Borrelli L., Minichino A., Pace A., Menna L.F., Fioretti A. pag. 173

- *DERMANYSSUS GALLINAE* TRASMETTE VERTICALMENTE *SALMONELLA GALLINARUM*: PRIMA DIMOSTRAZIONE IN VITRO
Schiavone A., Pugliese N., Samarelli R., Circella E., D'Amico F., Camarda A. pag. 179

- RICERCA DI AVIAN METAPNEUMOVIRUS (aMPV) IN VOLATILI SELVATICI
Tucciarone C.M., Franzo G., Legnardi M., Lupini C., Catelli E., Quaglia G., Dal Molin E., Gobbo F., Cecchinato M. pag. 183

- UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI MOLECOLE VEGETALI IN UN MODELLO DI COCCIDIOSI IN POLLI DA CARNE
Tugnoli B., Piva A., Grilli E..... pag. 193

- **INDICE DEGLI AUTORIpag. 199**





PER RISOLVERE I PROBLEMI PIÙ COMUNI IN AVICOLTURA

la nostra gamma di prodotti liquidi naturali

Citrospir

E' utile come supporto nel corso di trattamenti veterinari contro il dolore ed i mali stagionali.



CitroClò 🐔🐓

Agisce a livello intestinale limitando gli effetti delle più diffuse problematiche digestive.



Ecotrofin® L-CX

Con oli di Meliaceae, aglio e timo. Riduce naturalmente le problematiche parassitarie intestinali.



ROSS 308 DELIVERS

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

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



Aviagen®





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

INNOVAZIONE

PROTEZIONE

VALORE
AGGIUNTO





Together, beyond animal health



L'INNOVAZIONE PER IL TUO SUCCESSO INIZIA DALL'INCUBATOIO

Il nostro impegno
per l'industria avicola

ASSOCIAZIONE VINCENTE

GLUTARALDEIDE

BENZALCONIO



Glutarsan®

BATTERI

MUFFE
e LIEVITI

VIRUS

DISINFEZIONE INTEGRALE



chemifarma S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA



EFFICACIA
CERTIFICATA



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

Scopri lo qui



www.bit.ly/1puntofcr

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

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

cobb-vantress.com



Elanco



MAXIBAN. LA SCELTA ELANCO, SENZA SORPRESE.

Elanco

Perchè rischiare, quando c'è

Maxiban™

Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2021 sono realizzate grazie al contributo di:

• ASCOR Business Unit di Vetoquinol Italia •

• AVIAGEN Italia •

• BOEHRINGER INGELHEIM •

• CEVA Salute animale •

• CHEMIFARMA •

• COBB •

• ELANCO Animal Health •

• FATRO •

• HIPRA •

• LALLEMAND •

• MSD Animal Health •

• ZOETIS Italia •

PREFAZIONE

Legnaro (PD), 12 ottobre 2021

Come consuetudine, pubblichiamo gli Atti del LX Convegno Nazionale e del VI Simposio Scientifico.

Dopo le restrizioni legate al COVID-19 che hanno inciso anche sulle attività della nostra Società scientifica nel 2020, il nostro convegno e il simposio ricominciano nuovamente a svolgersi in presenza. Ritorniamo con profondo piacere ed entusiasmo alla consueta formula dei nostri eventi che facilita scambi di opinioni e rafforza il clima di collaborazione e amicizia all'interno della SIPA e inoltre dà visibilità ai nostri sponsor che supportano le nostre attività scientifiche.

Per la prima volta, il nostro convegno si è collocato all'interno della rinnovata Fiera avicola a Rimini e ha avuto come tema le “Sfide sanitarie rilevanti per la moderna avicoltura”, dando aggiornamenti sull'epidemiologia dell'influenza aviaria e delle malattie virali immunodepressive e sul ruolo degli enterococchi nelle infezioni dell'apparato scheletrico del pollo da carne. Inoltre, è stato analizzato il Piano di controllo delle Salmonellosi, indicando i target raggiunti in un'ottica di condivisione di strategie e obiettivi futuri.

L'altro atteso appuntamento che riunisce i nostri soci è il VI Simposio Scientifico, che si terrà a Bologna il 19 novembre. Il numero e la qualità delle relazioni presentate mettono in risalto la vivacità scientifica della nostra Società e del nostro settore che, proprio grazie a queste stimolanti occasioni di aggiornamento e confronto, risulta pronto per le sfide future che ci attendono.

Prof. Mattia Cecchinato
Presidente SIPA

ATTI DEL LX CONVEGNO NAZIONALE SIPA

CONVEGNO

Sfide sanitarie rilevanti per la moderna avicoltura

Rimini (RN), 7 Settembre 2021



AGGIORNAMENTI SULL'INFLUENZA AVIARIA IN EUROPA

Terregino C.

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

L'epidemia di influenza aviaria del 2020-2021, con un totale di 3.777 focolai di influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) e circa 22.900.000 di volatili colpiti in 31 Paesi, sembra essere una delle più grandi epidemie di HPAI mai verificatesi in Europa. Ultimamente, tra maggio e settembre 2021, sono stati segnalati 162 focolai di virus HPAI in 17 paesi dell'UE e nel Regno Unito nel pollame (51), negli uccelli selvatici (91) e in cattività (20). Virus HPAI sono stati rilevati durante i mesi estivi nelle popolazioni di uccelli selvatici residenti principalmente nel nord Europa, ciò indica che questi virus sono ancora in circolazione e che l'epidemia non è ancora finita. Sulla base di queste osservazioni, sembra che la persistenza dell'HPAI A(H5) in Europa continui a rappresentare un rischio di continue incursioni virali negli allevamenti avicoli. Inoltre, durante l'estate 2021, sono stati rilevati virus HPAI nel pollame e in diverse specie di uccelli selvatici in aree della Russia collegate alle principali aree di migrazione degli uccelli acquatici selvatici; ciò è preoccupante a causa della possibile introduzione e diffusione di ulteriori nuovi ceppi virali attraverso gli uccelli selvatici che migrano durante l'autunno dai siti di nidificazione orientali ai siti di svernamento europei. Finora sono stati identificati diciannove diversi genotipi di virus in Europa e in Asia centrale dal luglio 2020, confermando un'elevata propensione di questi virus ad andare incontro ad eventi di riassortimento genetico. Recentemente sono stati segnalati in Cina quindici casi di infezioni umane dovute a virus HPAI (H5N6) e cinque casi umani dovuti al virus LPAI H9N2. Alcuni di questi casi sono stati causati da virus con geni strettamente correlati ai virus A(H5) che circolano in Europa. I virus finora identificati e caratterizzati conservano una preferenza per i recettori di tipo aviario, tuttavia, le segnalazioni di eventi di trasmissione di virus A(H5) a mammiferi e uomo in Russia, così come i recenti casi umani di A(H5N6) in Cina, indicano un rischio continuo di adattamento di questi virus ai mammiferi. Il rischio di infezione per la popolazione generale nell'UE è stato valutato come molto basso e basso per le persone esposte per motivi di lavoro, ma c'è preoccupazione a causa dell'elevata variabilità dei virus circolanti negli uccelli selvatici.



MALATTIE VIRALI IMMUNOSOPPRESSIVE: ANCORA UNA SFIDA PER IL SETTORE AVICOLO?

Lupini C.

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

Le malattie virali immunosoppressive causano perdite economiche nell'industria avicola poiché determinano maggiore sensibilità degli animali alle infezioni secondarie e compromettono la risposta immunitaria alle vaccinazioni. I virus della Bursite Infettiva Aviaria, dell'Anemia Infettiva del pollo e dell'Enterite Emorragica del tacchino sono i principali agenti virali immunosoppressivi, non-oncogeni, che colpiscono le specie avicole allevate. La Bursite Infettiva (BI) è sostenuta da *Infectious Bursal Disease Virus* (IBDV), virus a RNA bi-segmentato, appartenente alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. I quadri clinici di BI possono variare, a seconda della patogenicità del ceppo virale, da forme cliniche, con mortalità anche elevata, sostenute da ceppi *very virulent*, a forme cliniche o subcliniche in cui l'aspetto saliente è esclusivamente la immunodepressione. L'infezione da IBDV coinvolge principalmente i linfociti della linea B della borsa di Fabrizio determinando una soppressione anche di lunga durata della risposta anticorpale primaria. I ceppi IBDV vengono classificati in genogruppi sulla base della sequenza nucleotidica del gene che codifica per la proteina VP2, principale immunogeno virale, o dell'intero genoma. In numerosi paesi Europei si è potuta su questa base evidenziare la circolazione di IBDV originati dal riassortimento genetico fra ceppi *very virulent* e ceppi vaccinali vivi attenuati. In Italia, la vaccinazione per IBDV, ampiamente applicata in incubatoio con vaccini a immunocomplessi o ricombinanti, ha determinato la quasi totale riduzione delle forme cliniche nonostante circolino, anche in gruppi vaccinati, ceppi *very virulent*.

L'Anemia Infettiva del pollo è sostenuta da *Chicken Infectious Anemia Virus* (CIAV), virus a DNA appartenente alla famiglia *Anelloviridae*, genere *Gyrovirus*. L'infezione provoca forme cliniche quando avviene nelle prime settimane di vita. Tuttavia, la maggior parte dei polli è protetta dall'infezione precoce grazie agli anticorpi vaccinali di origine materna. L'infezione dopo le 3 settimane di età si manifesta prevalentemente in maniera subclinica ma può causare una significativa immunodepressione. Le cellule target del virus sono gli emocitoblasti nel midollo osseo e i precursori dei linfociti T. Nel nostro paese circolano in allevamenti di broiler, riproduttori o polli rurali, ceppi CIAV eterogenei dal punto di vista molecolare.

L'enterite emorragica del tacchino è una malattia virale che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita, la cui importanza economica è legata a mortalità ed immunodepressione transitoria determinate dal virus nei soggetti infetti. L'infezione può anche evolvere in forma subclinica con mortalità evidenziabile solo a seguito d'infezioni batteriche secondarie all'immunodepressione. L'agente eziologico è il Turkey siadenovirus, virus a DNA lineare a doppio filamento, comunemente denominato Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus (THEV), appartenente al genere *Siadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*. Dal 2018, per il controllo dell'Enterite Emorragica

del tacchino è stato introdotto in alcune regioni del nostro Paese, con permesso di importazione temporaneo, un vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth in grado di infettare persistentemente gli animali vaccinati e ridurre la pressione infettiva di THEV nell'allevamento del tacchino.

Le malattie virali immunosoppressive risultano sotto controllo nel settore avicolo grazie all'ampio utilizzo della vaccinazione; tuttavia la circolazione di ceppi di campo con caratteristiche genetiche peculiari e/o potenzialmente patogeni, anche in soggetti vaccinati, non deve essere sottovalutata per l'enorme impatto che l'immunosoppressione ha sulla salute ed il benessere animale e la redditività dell'allevamento avicolo.

“PIANO NAZIONALE DI CONTROLLO DELLE SALMONELLOSI NEGLI AVICOLI (PNCS): PASSATO, PRESENTE E FUTURO”

Cibin V.

SCS4 - Epidemiologia veterinaria, IZS Venezia

Il Piano Nazionale di Controllo delle Salmonellosi negli avicoli (PNCS) rappresenta uno strumento, basato sul controllo di alcuni sierotipi di *Salmonella*, identificati come rilevanti per la salute pubblica, a livello di produzione primaria, avente come obiettivo la riduzione del numero di casi umani di salmonellosi.

Il PNCS attualmente in vigore in Italia copre il triennio 2019-2021, ed è basato sulla normativa comunitaria, che attraverso Regolamenti specifici e trasversali definisce le modalità di controllo di alcuni sierotipi di salmonella. La storia recente del controllo delle zoonosi a trasmissione alimentare e più generalmente le strategie su cui l'Europa basa la tutela della sanità pubblica garantendo il maggior livello possibile di sicurezza alimentare, trova le sue origini nel “libro bianco per la sicurezza alimentare” (pubblicato nel 2000) e nel Regolamento 178/2002. In particolare, per quanto riguarda *Salmonella*, la norma comunitaria di riferimento è il Regolamento 2160/2003, a cui hanno fatto seguito una serie di Regolamenti che forniscono in dettaglio obiettivi e strumenti per il controllo dei sierotipi di salmonella rilevanti per la salute pubblica a livello di produzione primaria. I Regolamenti che definiscono gli obiettivi di riduzione di prevalenza di sierotipi target negli avicoli sono i seguenti: Regolamento 200/2010 per quanto riguarda i riproduttori *Gallus gallus*, Regolamento 517/2011 per quanto riguarda le galline ovaiole, Regolamento 200/2012 per quanto riguarda i broiler ed infine il Regolamento 1190/2012 per quanto concerne i tacchini da riproduzione e da ingrasso. Per tutte le categorie avicole l'obiettivo corrisponde ad una percentuale massima di gruppi avicoli positivi a sierotipi rilevanti pari all'1%, tranne che per le galline ovaiole in cui è pari al 2%. Inoltre per quanto riguarda i sierotipi rilevanti, questi corrispondono a: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, variante monofasica di *S. Typhimurium* in tutte le categorie avicole, tranne che nei riproduttori *Gallus gallus* dove sono identificati quali sierotipi target anche *S. Hadar*, *S. Virchow* e *S. Infantis*.

In merito ai Regolamenti trasversali si portano all'attenzione il Regolamento 1777/2006 in merito all'utilizzo di antibiotici e vaccini vivi ed il neonato Regolamento 268/2019 in merito a metodiche analitiche e modalità di prelievo dei campioni; quest'ultimo non ancora integrato nel PNCS italiano.

Le caratteristiche delle strategie di controllo identificate a livello europeo non possono prescindere da quelle che sono i tratti caratterizzanti di questo agente di zoonosi. *Salmonella* rappresenta un numeroso gruppo di microrganismi di cui si riconoscono più di 2600 sierotipi (elenco in continuo aggiornamento come dimostrato anche dalla recente identificazione del sierotipo “Abeokuta” da parte del Centro di Referenza Italiano per le Salmonellosi, <https://www.izsvenezie.it/isolato-ceppo-nuovo-sierotipo-salmonella/>), che possono essere molto diversi tra loro anche dal punto di vista epidemiologico. Senza entrare nei dettagli *Salmonella* è in genere un microrganismo che presenta le seguenti caratteristiche: è ubiquitario,

presenta un'ampia varietà di ospiti, è molto resiliente, alcuni sierotipi in particolare mostrano resistenza nei confronti di antibiotici (compresi quelli definiti come critici per la salute umana), presenta elevata persistenza nell'ambiente, può trasmettersi sia orizzontalmente che verticalmente (con diversa efficacia a seconda del sierotipo) ed infine in molti casi provoca infezioni sub-cliniche e quindi non facilmente identificabili.

Le caratteristiche di questo agente di zoonosi rendono particolarmente importante, al fine dell'identificazione di strategie di controllo, l'acquisizione sistematica di dati in merito alla sua diffusione "from farm to fork". La norma europea di riferimento che definisce le modalità di raccolta di dati per il monitoraggio delle zoonosi (inclusi i focolai nell'uomo) e degli agenti di zoonosi, è la Direttiva 2003/99, la quale rappresenta la base normativa per la realizzazione del report annuale curato da EFSA (European Food Safety Authority) ed ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Sono i dati riportati in questa pubblicazione che permettono di valutare l'evoluzione nel tempo dei casi umani di salmonellosi e delle prevalenze, in particolare nei gruppi avicoli.

Osservando i dati relativi al numero di casi umani di salmonellosi, sia europei che italiani, del 2004 e del 2019 (i più recenti disponibili) appare evidente l'importante riduzione (si passa da 192.000 casi circa a 88.000 casi circa in Europa e da 6.600 casi circa a 3.200 casi circa in Italia); tale risultato è indubbiamente da attribuire all'applicazione a livello europeo dei piani di controllo nel settore avicolo di cui al Regolamento 2160/2003.

Tuttavia da alcuni anni la Commissione Europea si sta interrogando su alcuni aspetti relativi all'applicazione dei piani di controllo ed in particolare in merito all'efficacia dei target intesi come percentuale di gruppi avicoli positivi e sierotipi rilevanti per la salute pubblica.

Tali perplessità sono conseguenti a due osservazioni in particolare. La prima è relativa al fatto che nonostante da diversi anni la maggior parte dei Paesi Membri soddisfi gli obiettivi relativi alla produzione primaria, il numero di casi umani, in decrescita fino al 2013, ha registrato poi un leggero aumento per poi stabilizzarsi a partire dal 2015; ovvero in apparenza i sierotipi target non sembrano più corrispondere in modo efficace ai sierotipi effettivamente rilevanti per la salute pubblica; inoltre osservando la prevalenza dei gruppi avicoli positivi a tutti i sierotipi di *Salmonella*, si nota in generale un trend crescente ed in alcuni casi questo trend è statisticamente significativo. La seconda è relativa al fatto che negli ultimi anni si sono verificati diversi focolai di salmonellosi che hanno interessato più Paesi Europei, quasi tutti causati dall'esposizione dei consumatori a *S. Enteritidis* attraverso le uova, da cui la riflessione che il target pari al 2% per le galline ovaiole vada abbassato.

La valutazione dell'impatto della revisione dei target nei riproduttori *Gallus gallus* e nelle galline ovaiole è oggetto dell'opinione dell'EFSA, a seguito della richiesta della Commissione Europea, pubblicata nel 2019 (EFSA Journal 2019;17(2):5596, 155 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>).

Per quanto riguarda i target per i riproduttori *Gallus gallus*, EFSA conclude che l'opzione più efficace sarebbe quella di mantenere il target 1% ma di includere tutti i sierotipi; in alternativa propone l'eliminazione di *S. Hadar* e *Virchow* e la loro sostituzione con *S. Kentucky* ed un ulteriore sierotipo da scegliere tra *S. Heidelberg*,

S. Thompson od un terzo sierotipo a scelta da parte di ciascun Paese Membro. Per quanto riguarda il target per le galline ovaiole, EFSA stima, attraverso un *source attribution model*, che ridurre il target da 2% a 1%, mantenendo gli stessi sierotipi attuali, comporterebbe una riduzione del numero di casi umani riconducibile alle galline ovaiole, a livello europeo, pari al 53% circa.

EFSA inoltre segnala alcuni aspetti in merito all'applicazione dei piani di controllo e alla qualità dei dati raccolti; in particolare evidenzia alcune criticità in merito alla capacità di intercettare in modo repentino le positività di *S. Enteritidis* a livello di produzione primaria ed in generale criticità nell'efficacia dell'applicazione dei piani; ravvede inoltre la necessità di aumentare la qualità dei dati raccolti in termini di attribuzione del sierotipo identificato per tutti i ceppi isolati, come anche il maggior utilizzo del sequenziamento (Whole Genome Sequencing) per la caratterizzazione degli isolati, anche ai fini di ridurre l'incertezza dei modelli di *source attribution*.

La posizione dell'Italia rispetto alla revisione dei target, sulla base anche della valutazione dei dati nazionali da parte del Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (si rimanda a tal proposito alla pubblicazione di seguito di Leati M. *et al*, *Epidemiology and Infection* 149, e160, 1–3. <https://doi.org/10.1017/S0950268821001230>, 2021) è conservativa per quanto riguarda il target nelle galline ovaiole, ovvero è favorevole a mantenere il target al 2%, ed in merito ai riproduttori *Gallus gallus* è favorevole a prevedere il mantenimento di 5 sierotipi target ed alla identificazione del quinto sierotipo target da parte di ciascun Paese Membro.

Osservando i dati nazionali relativi al PNCS 2020, si osserva una situazione non molto diversa rispetto all'anno precedente, anche se in generale si nota da alcuni anni un trend crescente di gruppi positivi a tutti i sierotipi di *Salmonella*. Per quanto riguarda i target, nel 2020, con l'eccezione dei riproduttori tacchini, questi vengono sempre soddisfatti.

Ciò che si evidenzia, in generale, è una diversa percentuale di gruppi positivi identificata attraverso l'attività di autocontrollo rispetto al controllo ufficiale, con una percentuale più elevata di gruppi positivi identificata attraverso il controllo ufficiale.

Per quanto riguarda la distribuzione di frequenza dei sierotipi, anche in questo caso non si osservano sostanziali differenze rispetto al 2019, fatta eccezione per *S. Kentucky* nei riproduttori *Gallus gallus*, che ritorna ad essere isolata poco frequentemente nel 2020 (1 solo gruppo positivo) rispetto al picco del 2019 (ben 18 gruppi positivi). Per quanto riguarda *S. Infantis*, pur rimanendo questo sierotipo quello più frequentemente isolato nei gruppi di broiler, si nota, in questa categoria produttiva, una lieve decrescita rispetto al 2019; nessun gruppo di riproduttori *Gallus gallus* è stato invece identificato positivo per questo sierotipo nel 2020.

È importante sottolineare inoltre che in merito ai dati sui sierotipi il livello qualitativo è decisamente elevato, ovvero la percentuale di isolati di *Salmonella* per cui non viene fornita indicazione rispetto al sierotipo effettivamente attribuito è generalmente molto bassa.

Infine per quanto riguarda il nuovo PNCS, in vigore a partire dal 2022, sono previsti alcuni cambiamenti sostanziali, con l'obiettivo di aumentare la capacità di

intercettare precocemente le positività a sierotipi rilevanti per la salute pubblica. Rientra in questo obiettivo anche l'integrazione del PNCS con le modalità di campionamento ed analisi di cui al Regolamento 268/2019. È prevista inoltre, una maggiore frequenza dei campionamenti in autocontrollo per le galline ovaiole, come anche l'aumento del numero minimo di sovrascarpe da prelevare in autocontrollo (da 2 a 3). Sono oggetto di valutazione anche le misure da intraprendere in caso di identificazione di positività a sierotipi rilevanti in gruppi di ovaiole che producono uova di categoria B e le strategie di gestione della pollina positiva a sierotipi rilevanti; in entrambi i casi con l'obiettivo di ridurre al minimo il rischio di mantenimento e diffusione in azienda (e verso altre aziende) dell'agente di zoonosi identificato. Infine è previsto un maggiore investimento di risorse per la formazione ed in generale per la verifica delle attività svolte nell'ambito del PNCS.

AGGIORNAMENTI SUL RUOLO DEGLI ENTEROCOCCHI NELLE INFEZIONI DELL'APPARATO SCHELETRICO DEL POLLO DA CARNE

Palazzolo L., Cordioli B., Cornaggia M., Viel L., Drigo I., Bano L.

Sezione Diagnostica di Treviso, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Gli enterococchi sono cocchi Gram-positivi, disposti in catene, anaerobi facoltativi precedentemente inclusi nel gruppo “D” di Lancefield del genere *Streptococcus*. Solo in seguito al sequenziamento dell'rRNA 16S è stato creato un genere a se stante che, ad oggi, comprende 36 specie diverse, di cui 26 ritenute patogene per l'uomo e che prende il nome di *Enterococcus* (Fisher e Phillips, 2009).

In patologia aviare gli enterococchi sono responsabili di onfaliti, endocarditi ed encefaliti e di alcune infezioni del sistema scheletrico quali l'artropatia amiloide sostenuta da *E. faecalis*, che colpisce ovaiole e riproduttori, ed *E. cecorum* responsabile di osteonecrosi e spondilite del broiler. La trasmissione degli enterococchi può avvenire sia per via diretta che indiretta. La prima è il frutto della contaminazione dell'uovo con materiale fecale, mentre la seconda può avvenire per via inalatoria, orale, transcutanea o iatrogena (es. lotti vaccinali contaminati da *E. faecalis*) (Pattison *et al.*, 2007).

Dal 2010 è aumentata sensibilmente la letteratura scientifica che tratta problematiche sanitarie dell'apparato scheletrico del pollo da carne associate a *Enterococcus cecorum*. Tale microrganismo fu isolato per la prima volta da Devreese e coll. nel 1983 dall'intestino di pollo e classificato come *Streptococcus cecorum*. Nel 1989 fu tassonomicamente collocato nel genere *Enterococcus*, e nel 2002 fu isolato per la prima volta da ossa lunghe di polli da carne con alterazioni della deambulazione, in Scozia (Wood *et al.*, 2002).

Successivamente *E. cecorum* è stato associato prevalentemente ad infiammazioni vertebrali (spondiliti) che colpiscono il broiler.

E. cecorum è un patogeno anaerobio facoltativo, catalasi e ossidasi negativo, che predilige atmosfere con 5% di CO₂ e terreni solidi addizionati col 5% di globuli rossi di pecora incubati preferibilmente a 35 °C. Studi recenti hanno dimostrato che la sua persistenza nell'ambiente è inversamente proporzionale alla temperatura e all'umidità. Ad esempio, resiste nelle lettiere per 45 giorni a 25 °C e con 78 % UR, mentre può resistere anche 800 gg a 15 °C e con 35% di UR (Grund *et al.*, 2020).

La spondilite da *E. cecorum* è considerata una patologia emergente e cosmopolita, che ha fatto la sua comparsa in Italia nel 2009 (Bano *et al.* 2010). Colpisce preferibilmente polli da carne maschi a partire da 28 giorni di vita e riproduttori di 6-8 settimane, con mortalità e morbilità che possono raggiungere rispettivamente il 35% e il 15% (Jung *et al.*, 2018). La malattia è stata segnalata in ibridi Ross 308, Cobb 500, Pureline hybrids (Dinev, 2012).

Il quadro sintomatologico associato alla spondilite prende il nome di “kinky back”: atteggiamento dovuto al danno spinale che costringe il soggetto a poggiare sui tarsi o sul coccige con gli arti inferiori estesi cranialmente.

Le lesioni caratteristiche sono delle osteonecrosi o osteomieliti in cui il tessuto osseo è danneggiato e progressivamente sostituito da materiale necrotico-eterofilico osservabile a livello di corpo vertebrale o di epifisi femorale prossimale. Le lesioni a carico del rachide sono classicamente localizzate a livello della sesta vertebra toracica (T6), che è l'unica vertebra mobile della colonna vertebrale del pollo. Essa infatti si articola cranialmente con il *notorium*, derivante dalla fusione delle vertebre toraciche da T2 a T5, e caudalmente con T7, a sua volta fusa con il *sinsacrum*. Ne deriva che soggetti a rapido accrescimento come gli ibridi moderni, subiscono sollecitazioni meccaniche che si concentrano su questa vertebra comportando microfratture ossee simili a quelle che si osservano nelle ossa lunghe in caso di osteocondrosi deissecante (ODC), che può essere seguita da osteonecrosi batterica con osteomielite (BCO) (Wideman, 2016). Infatti, in casi di setticemie da *E. cecorum*, le microemorragie intraossee favoriscono la disseminazione in tale tessuto dei batteri circolanti e un loro successivo sequestro all'interno di tessuto osseo immaturo. Qui i batteri cominciano la loro azione litica nei confronti del tessuto osseo e la conseguente spondilite, con richiamo di cellule infiammatorie. Con il tempo, nel corpo vertebrale, viene a crearsi un nucleo di materiale osteo-necrotico-eterofilico che può fistolizzare sia verso la cavità celomatica, dove viene racchiuso dalla una capsula fibrosa che circonda classicamente la lesione, che verso il canale vertebrale dove può causare compressioni del midollo spinale in seguito al cedimento del tessuto vertebrale patologico. A volte viene interessata anche T7, dove si può osservare la stessa lesione nodulare presente in T6 e che gli anglosassoni definiscono comunemente come ascessi vertebrali (Wideman, 2016).

Le lesioni e la sintomatologia (kinky back) che si osservano in caso di spondilite sono solo le manifestazioni più evidenti di setticemie precoci da *E. cecorum*. Infatti, non è infrequente l'isolamento di *E. cecorum* da organi parenchimosi o da segmenti ossei di pulcini di pochi giorni. Nel corso del 2021, presso il laboratorio di Treviso dell'IZ-SVe, sono stati isolati 129 ceppi extra-intestinali di *E. cecorum* da altrettanti soggetti appartenenti a 47 gruppi di broiler, originati da 4 diversi incubatoi. Sebbene la maggior parte dei soggetti conferiti avesse 3 settimane d'età, *E. cecorum* è stato isolato anche da sierose, ossa lunghe e sacco vitellino di pulcini di 3-4 gg con evidenti problemi di deambulazione o con mortalità anomala. Nei soggetti di 3 settimane *E. cecorum* è stato isolato prevalentemente da pericardio (34,2% dei soggetti totali), femore (30,4%) e da cervello (13,9%).

La spondilite da *E. cecorum* risulta correlata direttamente al grado di colonizzazione intestinale osservato nella prima settimana di vita (anche nel primo giorno), come hanno dimostrato 2 studi longitudinali di tipo caso-controllo, condotti con due metodiche diverse: una di batteriologia classica e l'altra su base molecolare (Borst *et al.*, 2017, Jung *et al.*, 2017). In particolare, nello studio di Borst e coll. (2017), alla colonizzazione intestinale nella prima settimana di vita, era associata la concomitante presenza di *E. cecorum* nella milza e successivamente nelle vertebre. Inoltre, studi di metagenomica sulle comunità microbiche intestinali del pollo da carne, hanno ampiamente dimostrato come *E. cecorum*, e gli enterococchi in generale, siano normali componenti del microbiota intestinale di soggetti "adulti" (> 21 gg), mentre dovrebbero essere pressoché assenti in pulcini di pochi giorni, evidenziando come l'elevata carica intestinale di *E. cecorum* a quest'età sia un reperto effettivamente anomalo (Shaufi *et al.*, 2015).

I ceppi di *E. cecorum* in grado di dare la malattia sono distinguibili da quelli commensali sulla base (i) della loro positività a un test di mortalità embrionale (Borst *et al.*,

2014), (ii) della resistenza alla lincomicina, (iii) dell'incapacità di fermentare il mannitolo, (iv) dell'arrangiamento del sistema CRISPR-cas di tipo I-C, (v) dalla percentuale di similarità genetica (>70% in PFGE), e dalla presenza di loci genetici che codificano per la (vi) capsula polisaccaridica e per le (vii) proteine d'adesione al collagene (Borst *et al.*, 2012, Borst *et al.*, 2015).

Caratterizzando geneticamente (PFGE) 42 ceppi di *E. cecorum* (40 di pollo e 2 di bovino) è stato possibile osservare che quelli isolati da pollo differiscono da quelli di altre specie e che ceppi di uno stesso focolaio sono cloni o presentano omologia maggiore dell'80%, indipendentemente dall'organo d'isolamento (dati lab. di Treviso, IZSve). In questo studio erano inclusi 2 ceppi isolati da 2 allevamenti diversi ma della stessa partita d'origine di pulcini e che si sono dimostrati dei cloni. Tale evenienza è stata descritta anche in un altro studio dove i ceppi isolati da 2 episodi di malattia in allevamenti che avevano accasato pulcini della stessa partita, mostravano una similarità genetica > 90% (Robbins *et al.*, 2012).

L'isolamento precoce di *E. cecorum* può essere effettuato su pulcini sintomatici di pochi giorni con disturbi al sistema locomotore, dopo aver disarticolato la testa femorale, quindi esponendo la cartilagine articolare dell'epifisi prossimale del femore. Cauterizzando la cartilagine articolare si preleva un tassello osseo epifisario e un campione midollare impiegando una siringa. Il campione viene inoculato in brodo HIB (Brain Heart Infusion broth) piastrato su Columbia Agar con aggiunta del 5% di sangue e incubato alla temperatura di 35°C per 24-48 ore in microaerofilia (5% di CO₂).

Le consuete procedure per l'isolamento degli enterococchi ambientali, come l'isolamento in terreni contenenti bile (es. BEA), sono inefficaci per *E. cecorum*. Il suo isolamento da matrici altamente contaminate (es. scarti schiusa, intestini, etc...) richiede l'impiego di brodi selettivi contenenti aminoglicosidi e terreni finali agarizzati al sangue (Suyemoto *et al.* 2016).

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

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

Potrebbe essere interessante valutare l'effetto della microbizzazione delle lettieri con flore non patogene competitive per cercare di abbattere la carica ambientale di *E. cecorum*.

In conclusione, possiamo affermare che nei gruppi colpiti da spondilite, *E. cecorum* colonizza massivamente l'intestino sin dai primi giorni di vita dando luogo a setticemie e a localizzazione ossea, favorita da microemorragie in tale sede collegate a ODC. I ceppi di *E. cecorum* isolati da lesioni presentano caratteristiche biochimiche, genetiche e di virulenza diverse da quelli intestinali ritrovati in soggetti sani o isolati in altre specie. In tutte le lesioni di uno stesso gruppo emerge un unico clone patogeno, probabilmente dotato di caratteristiche di maggiore diffusibilità rispetto ai commensali.

BIBLIOGRAFIA

1. Bano, L., Bonci, M., Drigo, I., Ferro, T., Vascellari, M., Cesca, A., *et al.* (2010). Spondilite da *Enterococcus cecorum* nel pollo da carne. 49° Convegno Della Società Italiana Di Patologia Aviaria (SIPA), Forlì. 81-85.
2. Borst, L. B., M. M. Suyemoto, S. Keelara, S. E. Dunningan, J. S. Guy, and H. J. Barnes. A chicken embryo lethality assay for pathogenic *Enterococcus cecorum*. *Avian Dis.* 58:244–248. 2014
3. Borst, L. B., M. M. Suyemoto, E. H. Scholl, F. J. Fuller, and H. J. Barnes. Comparative genomic analysis identifies divergent genomic features of pathogenic *Enterococcus cecorum* including a type IC CRISPR-Cas system, a capsule locus, an *epa*-like locus, and putative host tissue binding roteins.
4. PLoS One 10:e0121294. 2015
5. Borst, L. B., Suyemoto, M. M., Sarsour, A. H., Harris, M. C., Martin, M. P., Strickland, J. D., ... & Barnes, H. J. (2017). Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in broiler chickens. *Veterinary pathology*, 54(1), 61-73.
6. Devriese, L. A., Dutta, G. N., Farrow, J. A. E., Van de Kerckhove, A., & Phillips, B. A. (1983). *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(4), 772-776.
7. Dinev, I. (2012). Ricketts: prevalence of its forms and association with other pathological conditions in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, 68(2), 239-243.
8. Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
9. Grund, A., Rautenschlein, S., & Jung, A. (2021). Tenacity of *Enterococcus cecorum* at different environmental conditions. *Journal of applied microbiology*, 130(5), 1494-1507.
10. Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M., & Alexander, D. (Eds.). (2007). *Poultry diseases*. Elsevier Health Sciences.
11. Robbins, K. M., M. M. Suyemoto, R. L. Lyman, M. P. Martin, H.J. Barnes, and L. B. Borst. An outbreak and source investigation of enterococcal spondylitis in broilers caused by *Enterococcus cecorum*. *Avian Dis.* 56:768–773. 2012.
12. Shaufi, M. A. M., Sieo, C. C., Chong, C. W., Gan, H. M., & Ho, Y. W. (2015). Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. *Gut pathogens*, 7(1), 1-12.
13. Suyemoto, M. M., Barnes, H. J., & Borst, L. B. (2017). Culture methods impact recovery of antibiotic-resistant *Enterococci* including *Enterococcus cecorum* from pre-and postharvest chicken. *Letters in applied microbiology*, 64(3), 210-216.
14. Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., & Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of nutrition*, 141(5), 769-776.
15. Wideman Jr, R. F. (2016). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. *Poultry science*, 95(2), 325-344.
16. Williams, A. M., Farrow, J. A. E., & Collins, M. D. (1989). Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Letters in applied microbiology*, 8(5), 185-189.

ATTI DEL VI SIMPOSIO SCIENTIFICO

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Bologna, 19 Novembre 2021



RUOLO DELLE INFEZIONI DA *ESCHERICHIA COLI* NELLE PERFORMANCE DI ANIMALI COMMERCIALI DELLA SPECIE *GALLUS GALLUS*

Cesca A.¹, Siclari C.¹, Vasumi G.¹, Alberti S.²

¹ *Veterinari liberi professionisti*

² *Zoetis Italia S.r.l. Via A Doria 40, Roma*

Summary

Poultry colibacillosis has been one of the major causes behind economic losses in the poultry production. Vaccination against colibacillosis is capturing increasing interest. The aim of this study was to demonstrate benefits from using a live, *aro A* gene-deleted vaccine against colibacillosis in broiler chickens, layers and breeders and its potential impact on reducing the use of antibiotics and improving performances of the animals.

In this study 2 broiler farms, 2 layers farms and 4 breeder farms were involved. Broiler chicks were vaccinated once at arrival by spray while pullets and breeders were vaccinated 2 times during rearing. Immunized broilers and layers received no antibiotic treatment while controls needed to be treated. In breeders, antibiotic treatment was reduced to 50% at least.

Average mortality has been reduced of 19% in broilers, 33% in breeders and 5 times in layers. Production increased of 7% in breeders 6% in layers in number of laid eggs, and 5% in weight gain in broilers. In layers beside other parameters eggs unavailable for commercialization per hen were reduced of 12%.

Vaccination of broilers, layers and breeders against *Escherichia coli* improved several parameters that should be considered for routine immunoprophylaxis.

INTRODUZIONE

La colibacillosi è una delle patologie dei polli da carne ovaiole e riproduttori che maggiormente causa perdite economiche e mortalità (Camarda, 2009). Spesso si considera *Escherichia coli* come un batterio di irruzione secondaria o di isolamento occasionale la cui patogenicità si esprime dopo disequilibri o disfunzioni dell'apparato respiratorio o immunosoppressione o altre cause infettive o non infettive. In situazioni critiche in cui i trattamenti antibiotici non risultano risolutivi si pensa ad un approccio immunologico soprattutto in animali di pregio con performance non ottimali o in quelle situazioni critiche in cui per motivi di resistenza o commerciali i trattamenti antibiotici sono da evitare (Düngelhoef et al., 2014; Fischer et al., 2017). Diversi studi hanno dimostrato i vantaggi ottenuti sulle performance con un'immunità attiva cellulo-mediata con un vaccino vivo per *E. coli* delecto del gene *aro A* e l'economicità del gruppo in diverse situazioni (La ragione et al., 2013; Mombarg et al., 2014, Alberti 2016, Alberti et al., 2019), altri studi hanno dimostrato come la presenza di un vaccino vivo per *E. coli* modifichi il microbioma intestinale e apporti dei benefici economici diretti ed indiretti in più categorie produttive che giustificherebbe un approccio immunologico di routine in ogni pollo (Smialek et al., 2020) o tacchino (Chrétien et al., 2021).

In questo studio abbiamo analizzato allevamenti moderni con un buon manage-

ment in tre categorie commerciali: riproduttori, ovaiole commerciali e polli da carne standard, confrontando i risultati degli animali con o senza immunità attiva verso *E. coli*.

MATERIALI E METODI

Sono stati considerati solo allevamenti italiani confrontabili, con una buona reportistica delle performance, buon management, ventilazione forzata, all'interno di un circuito integrato o semi-integrato.

L'immunizzazione è avvenuta tramite somministrazione di un vaccino vivo per *E. coli* delecto del gene *aro A*, secondo il protocollo stabilito dal veterinario aziendale. Non sono state introdotte altre differenze nei piani vaccinali. Gli animali provenivano dallo stesso incubatoio o incubatoi simili. Tutti gli animali hanno ricevuto un intenso programma immunizzante contro le principali malattie respiratorie ed immunosoppressive.

Sono stati confrontati i parametri produttivi tra animali immunizzati e non ed eventuali trattamenti antibiotici.

Per il pollo da carne sono stati confrontati 2 capannoni dello stesso allevamento, uno immunizzato e uno controllo, ed un allevamento di un singolo capannone immunizzato. Gli animali di genetica Ross 308 accasati erano 25000 per capannone e l'immunizzazione per *E. coli* avveniva, tramite somministrazione spray con la dose raccomandata dal produttore del vaccino, all'arrivo prima del rilascio dei pulcini.

Nei riproduttori sono stati confrontati 4 allevamenti (A, B, C e D) immunizzati 2 volte in fase di accrescimento pre-deposizione con somministrazione in acqua di bevanda di un vaccino vivo per *E. coli*; il confronto è stato fatto con 4 cicli consecutivi vaccinati rispetto a 2 cicli precedenti non vaccinati.

Nelle ovaiole commerciali sono stati confrontati 2 allevamenti (A e B) immunizzati 2 volte con vaccino vivo per *E. coli* in fase di accrescimento pre-deposizione e il confronto è stato fatto rispetto al ciclo precedente cresciuto nelle medesime condizioni ma non immunizzato verso *E. coli*.

RISULTATI

Polli da Carne

I polli sono cresciuti secondo gli standard, le femmine sono state macellate prima raggiunto un peso medio, mentre i maschi sono arrivati ad un peso superiore tra i 49 e 52 giorni di età. Il gruppo controllo ha avuto una mortalità e sintomatologia tali da necessitare un trattamento antibiotico con Sulfamidici e Trimetoprim a 35 giorni. I gruppi immunizzati non hanno mostrato sintomatologia né alcun bisogno di trattamenti.

Per quanto riguarda le performance, gli animali immunizzati sia maschi che femmine hanno mostrato una minor mortalità dai 20 giorni in poi, nei maschi la differenza è stata più rilevante rispetto ai controsessi (Figura 1 e Figura 2). Minor numero di morti e minori animali di scarto (-19%) hanno portato gli animali immunizzati ad una differente produzione, ad un maggior numero di animali vivi inviati al macello rispetto ai controlli (Figura 3), ed un peso medio macellato superiore del 5%.

Tabella 1: Risultati produttivi nei polli da carne, in 2 gruppi vaccinati e uno di controllo.

	IMMUNI 1	IMMUNI 2	CONTROLLI
MORTI	3,41%	2,83%	3,84%
PESO MEDIO	2,68	2,55	2,49
IC	1,66	1,77	1,68

Figura 1: Mortalità media dei polli da carne femmina a 20-30-40 giorni di età, in 2 gruppi vaccinati e uno di controllo.

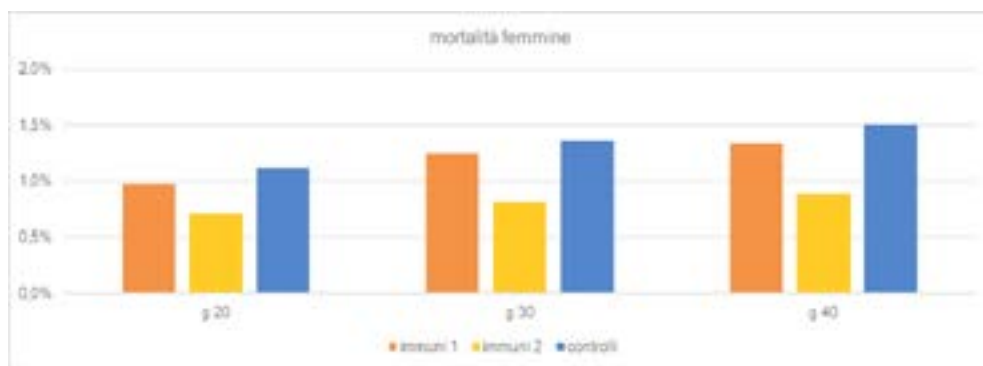
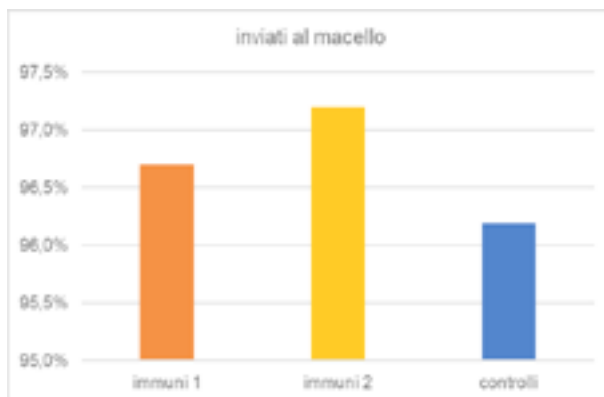


Figura 2: Mortalità media dei polli da carne maschi a 20-35-50 giorni di età, in 2 gruppi vaccinati e uno di controllo.



Figura 3: Percentuale di polli da carne inviati al macello, ovvero tolti gli animali morti e di scarto durante il ciclo, in 2 gruppi vaccinati e uno di controllo.



Ovaiole

Nell'allevamento A non si sono evidenziate particolari differenze nella mortalità tra immunizzati e controlli. Nell'allevamento B il gruppo di controllo ha avuto un picco di mortalità del 20% a 23 settimane di età dovuto a infezioni complicate da *E. coli* ed è stato necessario trattarlo diverse volte con colistina segnalata come efficace all'antibiogramma.

Confrontando i dati di produzione di entrambe gli allevamenti si è potuto notare che in ciascun allevamento la deposizione media per gallina in produzione tra le 20 e le 40 settimane è stata superiore di un 6% nei gruppi immunizzati (Figura 4). Ad un'attenta analisi si è osservato inoltre che la qualità delle uova risultava migliore negli allevamenti immunizzati portando ad una minor percentuale di uova di scarto in entrambi i siti considerati (-12% in media) (Figura 5).

Figura 4: Percentuale di deposizione media per gallina da uova per consumo umano nelle settimane 20-40 di età in 2 allevamenti confrontando vaccinati e controlli.



Figura 5: Percentuale cumulativa di uova di scarto rispetto alle uova per consumo umano prodotta per gallina a 48 settimane di età, confrontando vaccinati e controlli.



Riproduttori

Nei quattro allevamenti analizzati l'introduzione della vaccinazione verso *E. coli* ha permesso di diminuire la mortalità in ciascun gruppo (Figura 6) e ridurre la necessità di trattamenti antibiotici (Figura 7) riducendo anche la possibilità di instaurarsi di fenomeni di resistenza che avrebbero potuto coinvolgere anche la progenie. Mentre la riduzione di mortalità (-33%) si è evidenziata dal primo gruppo vaccinato in poi, la salute degli animali ha continuato a migliorare in modo progressivo con il mantenersi della vaccinazione nei cicli successivi portando ad un aumento delle uova per gallina accasata migliori di anno in anno negli animali immunizzati con andamenti diversi in ciascun allevamento (+7% in media) (Figura 8).

Figura 6: Percentuale di mortalità media di 4 allevamenti di riproduttori di polli da carne, confrontando 2 cicli successivi di controllo e 4 cicli consecutivi di animali vaccinati.

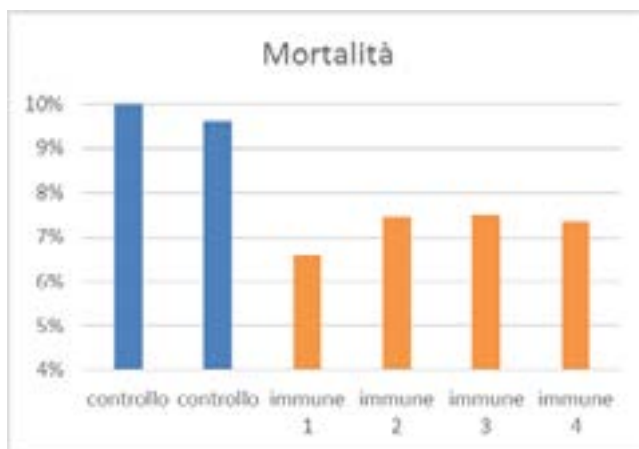


Figura 7: Numero di trattamenti antibiotici medi di 4 allevamenti di riproduttori di polli da carne, confrontando 2 cicli successivi di controllo e 4 cicli consecutivi di animali vaccinati.

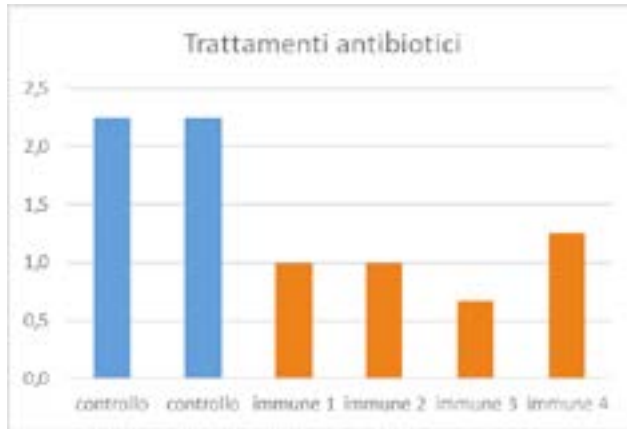
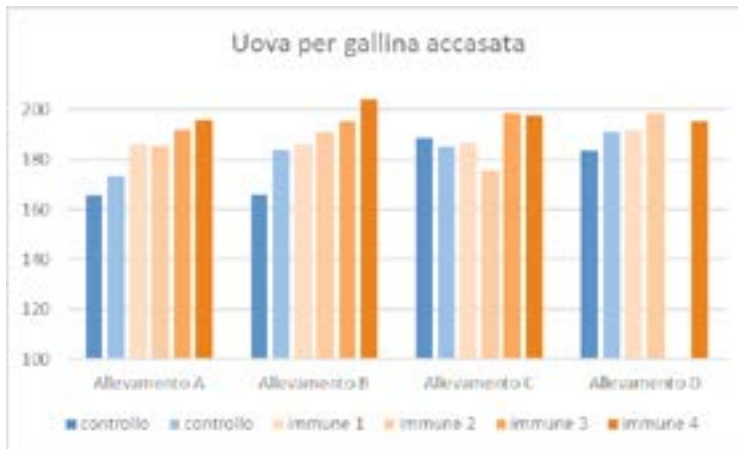


Figura 8: Numero medio di uova per gallina per ciclo di 4 allevamenti di riproduttori di polli da carne, confrontando 2 cicli successivi di controllo e 4 cicli consecutivi di animali vaccinati.



DISCUSSIONE

I polli da carne e le ovaiole commerciali immunizzati con vaccino vivo delecto del gene *aro A* non hanno avuto necessit  di alcun trattamento antibiotico a differenza degli animali controllo. Nei riproduttori i trattamenti antibiotici si sono ridotti almeno del 50%.

La mortalit  media   stata ridotta del 19% nei polli da carne, del 33% nei riproduttori e di 5 volte nelle ovaiole commerciali.

Si sono osservati ulteriori aspetti legati al miglior stato sanitario degli animali immunizzati come miglior peso o minor scarto di animali o di uova. Nel pollo da carne entrambi i sessi hanno mostrato un miglioramento di peso (+5%) e salute, i maschi in maniera più marcata rispetto alle femmine. Nelle ovaiole commerciali le galline immunizzate hanno prodotto più uova (+6%) con una riduzione della percentuale di uova scarto del 12%. Nelle galline riproduttrici si è apprezzato il miglioramento della vitalità e della produttività aumentando in media del 7% le uova prodotte per gallina e si è apprezzato come il ripetersi di cicli immunizzati ha permesso di migliorare di anno in anno il numero di uova e pulcini prodotti per gallina. Questa osservazione potrebbe essere legata al cambiamento del microbiota e al progressivo calo di ceppi *E. coli* APEC come segnalato da alcuni autori (Beirao et al., 2021).

L'immunizzazione verso *E. coli* con vaccino vivo delecto del gene *aro A* in polla da carne, ovaiole e riproduttori ha migliorato diversi parametri e permesso di azzerare o ridurre gli interventi con antibiotici; si potrebbe quindi considerare una vaccinazione di routine.

CONCLUSIONI

Il dato che emerge è che in tutti gli allevamenti considerati nelle tre categorie, i trattamenti antibiotici nei confronti di *E. coli* sono diminuiti all'introduzione di una appropriata immunizzazione verso questo patogeno con vaccino vivo delecto del gene *aro A*. Nelle diverse categorie produttive si è osservato un miglioramento della mortalità media e, anche dove la mortalità risultava simile, una maggior produttività del gruppo.

Le osservazioni sopra riportate di allevamenti con performance ottimali confortano l'idea già espressa da diversi autori (Alberti et al. 2019; Smialek et al., 2020; Chrétien et al., 2021) che l'immunizzazione di routine di polli da carne commerciali, di ovaiole commerciali per uova da consumo e riproduttrici verso *E. coli* con vaccino vivo delecto del gene *aro A* è giustificata dai vantaggi economici ottenuti. Alla luce della maggior pressione sulla riduzione degli antibiotici e la continua ricerca di migliori performance in cui ogni deviazione è da evitare, questo tipo di vaccinazione trova applicazione in tutte le diverse tipologie produttive in molti allevamenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberti S., *E. coli* esperienze con vaccino vivo, SIPA LV congresso annuale 23.9.2016; 123-124
2. Alberti S., Ceroni S. Cookson K 2019. *Performance results after vaccination with Live E.coli vaccine in Italy and USA*. WVPAC 2019, 365-366
3. Alberti S., Cookson K, Weber R., 2019 *Esperienze di campo dopo somministrazione di un vaccino batterico E.coli vivo*. SIPA LVIII congresso annuale 22.11.2019; 89
4. Beirao B.C.B., Ingberman M., Mesa D., Salles G.B.C., Muniz E.C., Caron L.F., *Effects of aroA deleted E.coli vaccine on intestinal microbiota and mucosal immunity*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease 2021 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101612>
5. Camarda A. *Infezioni da Escherichia coli*, Manuale di Patologia Aviaria, 2009;

6. Chrétien L., Boutant J., Lyazrhi F., Galliard N., *Retrospective assessment of E. coli vaccination in broiler turkeys under field conditions in 37 farms from Brittany (France)* Avian Disease 2021 under publication
7. Dünghoef K, Westermann P, Windhaus H. *Clear reduction of antibiotic treatments due to application of an E. coli live vaccine in broilers – a case report.* Prakt. Tierarzt. 2014., 95 (2): 158-163
8. Fischer S., Weber R., Haverkamp C., *Vaccination of broilers with a live Escherichia (E.) coli vaccine leads to a reduction of antibiotic treatments.* WVPAC 2017, 288
9. La Ragione R. M., Woodward M. J., Kumar M., Rodenberg DJ., Fan H., Wales A. D., and Karaca K., *Efficacy of a Live Attenuated Escherichia coli O78:K80 Vaccine in Chickens and Turkeys,* Avian Diseases 57:273–279, 2013
10. Mombarg M, Bouzoubaa K, Andrews S, Vanimisetti HB, Rodenberg J, Karaca K. *Safety and efficacy of an aroA-deleted live vaccine against avian colibacillosis in a multicentre field trial in broilers in Morocco.* Avian Pathol 43, 276-281, 2014
11. Smialek M., Kowalczyk J., and Koncicki A., *Influence of vaccination of broiler chickens against Escherichia coli with live attenuated vaccine on general properties of E. coli population, IBV vaccination efficiency, and production parameters a field experiment,* Poultry Science 2020, 99:5452–5460

PROVE *IN VITRO* DI EFFICACIA ANTIMICROBICA DI *ALLIUM SATIVUM* NEI CONFRONTI DI *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR *ENTERITIDIS*

Casalino G., Bozzo G., D'Amico F., Camarda A., Lombardi R., Romito D., Circella E.

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

Summary

In the last years, there has been a more prudent use of the drugs in livestock farms to reduce the risk of onset of antibiotic resistance. Therefore, the possible use of alternative products such as natural essences has been considered with greater interest. Some plants such as cinnamon, ginger, neem, turmeric, garlic, onion seem to have antiviral, antifungal, or antimicrobial activities but, despite those potentials, scientific studies about these properties are still only a few. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (S. Enteritidis) may cause disease in poultry, but it is also responsible for human food poisoning. The aim of this study has been to evaluate the efficacy of garlic against S. Enteritidis and to define the MIC₉₀ and MIC₅₀ values. The study was carried out *in vitro*, testing 26 S. Enteritidis strains, identified in laying hens coming from different farms. A preliminary trial of efficacy was carried out on two strains, S. Enteritidis and *Escherichia coli* respectively, using a concentration of garlic of 10 mg/ml (1 %). Later, 26 strains of S. Enteritidis in concentrations 10⁶ UFC and 10⁴ UFC were tested with different concentrations of garlic, ranging from 10 mg/ml to 1 mg/ml. Based on the obtained results, intermediate concentrations of garlic, 5 mg/ml to 4 mg/ml and 4mg/ml to 3mg/ml were used to test 10⁶ UFC and 10⁴ UFC, respectively. The obtained data were statistically analysed. The MIC₉₀ was 4.75 mg/ml for strains tested with 10⁶ UFC concentration and 4 mg/ml for strains tested with 10⁴ UFC concentration. The results highlight the potential efficacy of garlic to inhibit the growth of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis *in vitro*. The efficacy was dependent on the microbial concentration used. *In vivo* efficacy trials will be crucial to confirm the efficacy of garlic against S. Enteritidis and to assess the possibility of using garlic in poultry flocks to prevent the spread of the bacterium in the field.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è assistito ad un interesse crescente verso modalità di controllo di potenziali patogeni negli allevamenti zootecnici, alternative all'uso del farmaco al fine di ridurre il rischio di insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. Sono state incrementate le misure di biosicurezza, sono stati elevati gli standard igienico-sanitari all'interno degli allevamenti, sono state regolate le densità degli animali e si è assistito ad un maggior ricorso alla profilassi vaccinale anche per la prevenzione di alcune forme batteriche.

La possibilità di ricorrere a sostanze naturali, o ai loro derivati, come alternativa all'uso di antibiotici ha inoltre spinto la comunità scientifica ad indagare circa la loro potenziale efficacia. Lo zenzero e la curcuma hanno proprietà antibatteriche

(Ibrahim et al., 2004). La cannella è stata utilizzata come rimedio naturale nei confronti di nausea, raffreddore e manifestazioni enteriche attribuite a virus. L'aloë sembra avere capacità antinfiammatorie, antiossidanti, ipoglicemizzanti e antibatteriche (Fani e Kohanteb, 2012). Il neem, grazie ai suoi componenti, presenta effetto antifungino, antipiretico, antinfiammatorio, antiartritico, diuretico, immunomodulatore (Biswass et al., 2002) e si è dimostrato inoltre efficace nei confronti di parassiti, insetti e artropodi ematofagi (Camarda et al., 2018). La propoli e il polline si sono rivelati validi antibatterici, antimicotici, antivirali e hanno dimostrato di avere poteri analgesici, antinfiammatori, immunostimolanti e antiossidanti (Babinska et al., 2012). Anche l'olio essenziale di menta ha un'efficace attività antibatterica, in particolare nei confronti di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis e *Listeria monocytogenes* (Tassou et al., 1995). Alcuni studi hanno evidenziato che l'aglio riduce la glicemia ed il colesterolo ematico ed ha attività antinfiammatoria e anticancerogena. Inoltre, l'aglio sembra avere capacità antibatteriche nei confronti di alcuni ceppi di *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* meticillino-resistenti (Jeong et al., 2014).

Considerate tali potenzialità, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficacia dell'aglio nei confronti di ceppi di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. e. subsp. e. ser. Enteritidis*). Questo germe è un potenziale patogeno per il pollame, in cui può indurre quadri morbosi caratterizzati da enteriti, cali di produzione e mortalità ma, attraverso la contaminazione di carne e uova, è anche responsabile di tossinfezioni alimentari nell'uomo.

MATERIALI E METODI

Stipiti utilizzati e allestimento delle sospensioni batteriche

Lo studio è stato condotto *in vitro* su 26 ceppi di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, precedentemente isolati in allevamenti di galline ovaiole per la produzione di uova da consumo, e stoccati a -20 °C in Brucella broth e glicerolo (10%) presso la Sezione di Patologia Aviaria del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari.

Tutti i ceppi sono stati coltivati su Tryptic Soy Agar (TSA) (OXOID) a 37 °C *overnight*, prima dell'esecuzione dei test. A partire da ciascun ceppo, sono state allestite due sospensioni batteriche con concentrazione rispettivamente pari a 1×10^6 UFC/ml e 1×10^4 UFC/ml. Per ottenere le concentrazioni predefinite, in accordo agli standard CLSI (2006), sono state preparate sospensioni batteriche pari allo standard 0,5 McFarland, corrispondente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. Le concentrazioni ottenute sono state confermate mediante diluizioni seriali e conta batterica in piastra. Dieci microlitri delle sospensioni con concentrazione pari a 10^8 UFC/ml sono stati seminati *a spot*, in modo da analizzare nei test la carica pari a 10^6 UFC mentre, per le prove condotte utilizzando la carica di 10^4 UFC, le sospensioni con concentrazione di 10^8 UFC/ml sono state diluite scalarmente in soluzione salina 0,9% sterile fino ad ottenere 10^6 UFC/ml e, di queste, 10 μ l sono stati seminati in ogni *spot*.

Preparazione dell'aglio e inclusione nei terreni

Per le prove di efficacia, è stato utilizzato aglio liofilizzato del commercio. La polvere liofilizzata è stata pesata e posta in acqua distillata sterile, in quantità dif-

ferenti in base alle diverse concentrazioni di aglio che ci è prefissati di testare. Le prove di efficacia sono state eseguite su agar Mueller Hinton (OXOID), ricostituito, sterilizzato in autoclave a 121 °C e successivamente portato a 50 °C prima dell'aggiunta, per inclusione al terreno, delle sospensioni di aglio alle diverse concentrazioni.

Test preliminare

Una soluzione all'1%, con concentrazione di aglio pari a 10 mg/ml, è stata utilizzata per una prima prova preliminare di efficacia su un ceppo di *Escherichia coli* (ATCC 25922) e un ceppo di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis. Dai batteri, sono state preparate sospensioni con carica di 10⁸ UFC/ml, seminate in piastra contenente agar Mueller-Hinton semplice e addizionato con aglio, con tre diversi metodi di semina: con ansa da batteriologia, con tampone sterile e a *spot*.

La presenza di aglio nel terreno addizionato ha comportato la totale inibizione della crescita sia di *E. coli* che di *Salmonella*, indipendentemente dalla modalità di semina.

Allestimento delle prove di efficacia

Sono state allestite diverse serie di piastre di agar Mueller Hinton, contenenti concentrazioni di aglio da 10 mg/ml a 1 mg/ml (10 mg/ml; 9 mg/ml; 8 mg/ml; 7 mg/ml; 6 mg/ml; 5 mg/ml; 4 mg/ml; 3 mg/ml; 2 mg/ml; 1 mg/ml), che sono state utilizzate per testare entrambe le concentrazioni batteriche (10⁶ UFC e 10⁴ UFC) per ciascun ceppo. Le piastre sono state incubate a 37 °C e la lettura dei risultati è avvenuta dopo 24 ore di incubazione. Ogni esperimento è stato effettuato due volte in due giorni diversi. Sulla base dei risultati ottenuti, le cariche batteriche di 10⁶ UFC sono state valutate con un range di concentrazioni di aglio da 5 mg/ml a 3,5 mg/ml (5 mg/ml; 4,75 mg/ml; 4,5 mg/ml; 4,25 mg/ml; 4 mg/ml; 3,75 mg; 3,5 mg) e quelle pari a 10⁴ UFC con concentrazioni da 4 mg/ml a 3 mg/ml (4 mg/ml; 3,75 mg/ml; 3,25 mg/ml; 3 mg/ml).

Valutazione statistica dei dati

I dati ottenuti dalle diverse prove di efficacia sono stati confrontati per valutarne la significatività statistica mediante il test esatto di Fisher a due code.

RISULTATI

Le concentrazioni di aglio superiori o uguali a 5 mg/ml sono risultate efficaci, inibendo la crescita di tutti i ceppi, indipendentemente dalla concentrazione batterica testata. I valori MIC₉₀ e MIC₅₀ sono risultati pari a 5 mg/ml in caso di carica pari a 10⁶ UFC, mentre solo 6 di 26 ceppi (23,07 %) sono stati completamente inibiti dalla concentrazione pari a 4 mg/ml (tabella 1). Nel caso delle cariche batteriche pari a 10⁴ UFC, MIC₉₀ e MIC₅₀ sono corrisposte a 4 mg/ml, con 24 ceppi (92,3 %) inibiti nella crescita su 26 ceppi testati. La concentrazione pari a 3 mg/ml si è rivelata inefficace per tutti i ceppi analizzati in concentrazione pari a 10⁶ UFC, mentre nel caso delle sospensioni in carica di 10⁴ UFC, ha inibito la crescita di un solo stipite batterico.

Tabella 1: Efficacia *in vitro* di EAA con concentrazioni da 10 mg/ml a 1 mg/ml

Concentrazione dell'estratto (mg/ml)	N° ceppi inibiti /N° ceppi analizzati (%)	
	10 ⁶ UFC*	10 ⁴ UFC*
10	26/26 (100)	26/26 (100)
9	26/26 (100)	26/26 (100)
8	26/26(100)	26/26 (100)
7	26/26 (100)	26/26 (100)
6	26/26 (100)	26/26 (100)
5	26/26(100)	26/26 (100)
4	6/26 (23.07)	24/26 (92.3)
3	0/26 (0)	1/26 (3.84)
2	0/26 (0)	0/26
1	0/26 (0)	0/26

* Carica batterica utilizzata

Analizzando l'efficacia delle concentrazioni di aglio intermedie, da 5 mg/ml a 3,5 mg/ml per gli *spot* 10⁶ CFU (tabella 2), la minima concentrazione inibente la crescita dei ceppi nel 90% dei casi (MIC₉₀) è risultata pari a 4,75 mg/ml, mentre una concentrazione di 4,5 mg/ml non era altrettanto efficace ($P < 0.001$), in quanto meno del 50% dei ceppi era inibito a questa concentrazione.

Tabella 2: Efficacia *in vitro* di EAA con concentrazioni da 5 mg/ml a 3,5 mg/ml e da 4mg/ml a 3 mg/ml

Concentrazione dell'estratto (mg/ml)	N° ceppi inibiti/N° ceppi analizzati (%)	
	10 ⁶ UFC*	10 ⁴ UFC*
5	26/26 (100)	-
4,75	25/26 (96.15)	-
4,5	9/26 (34.61)	-
4,25	6/26 (23.07)	-
4	6/26 (23.07)	24/26 (92,3)
3,75	0/26 (0)	22/26 (84,61)
3,5	0/26 (0)	11/26 (42.3)
3,25	-	0/26 (0)
3	-	0/26 (0)

* Carica batterica utilizzata

Nel caso delle concentrazioni di 10^4 CFU, la MIC_{90} è stata individuata a 4 mg/ml mentre la concentrazione di 3,75 mg/ml ha inibito la crescita di 22 ceppi su 26 e quindi di almeno il 50% (MIC_{50}). L'efficacia di quest'ultima concentrazione è risultata essere significativamente superiore rispetto a quella di 3.5 mg/ml ($P = 0.034$). Confrontando le due differenti concentrazioni batteriche utilizzate, a 4 mg/ml si osservava un effetto inibitorio su un solo ceppo in carica pari a 10^4 CFU, mentre la stessa concentrazione non aveva la stessa efficacia con sospensioni di 10^6 CFU ($P < 0.001$).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti evidenziano una buona capacità inibente dell'aglio *in vitro* nei confronti di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis. Tale capacità è risultata variabile e dipendente dalla carica batterica utilizzata. L'efficacia evidenziata dovrebbe essere legata ad un'attività prevalentemente batteriostatica piuttosto che battericida di questa sostanza, in quanto i valori di MIC sono generalmente inferiori a quelli di MBC (Minima Concentrazione Battericida) (Mohsenipour e Hassanshahian, 2015).

Studi sull'efficacia antimicrobica dell'aglio, condotti su singoli ceppi per specie batterica, hanno evidenziato *in vitro* valori di MIC pari a 6,25 mg/ml per *Streptococcus mutans* (Jain et al., 2015) e per *Salmonella e. subsp. e. ser. Tiphy*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* (Andualet, 2013), valore pertanto superiore rispetto ai valori di MIC_{90} ottenuti in questo studio per i ceppi di *S. e. subsp. e. ser. Enteritidis* testati. In un altro lavoro (Gull et al., 2012), comprendente anch'esso un solo stipite di *S. e. subsp. e. ser. Tiphy*, il valore di MIC ottenuto è risultato decisamente inferiore, pari a 0,02 mg/ml. Tali divergenze potrebbero essere attribuibili alla sensibilità individuale di un determinato ceppo, visto che in questi studi non vi era stato effettuato un confronto con altri ceppi, e alla carica batterica adottata.

Nel caso della valutazione dell'efficacia di sostanze naturali a differenza di quanto avviene in campo farmacologico, la divergenza di valori ottenuti può essere legata ad una mancata standardizzazione delle metodiche adottate nei diversi laboratori. Ad esempio, nei due studi citati su *S. e. subsp. e. ser. Tiphy*, in un caso (Andualet, 2013), la valutazione è stata effettuata attraverso diluizioni seriali in brodo, mentre nell'altro caso (Gull et al., 2012), la MIC è stata determinata in piastra in terreno solido secondo il metodo Kirby-Bauer, imbibendo con estratti di aglio, dischetti appositamente costruiti per la sperimentazione. Inoltre, il differente pannello di concentrazioni adottato nei due studi ha portato nella ricerca condotta da Andualet (2013) ad ottenere valori di MIC pari a 6,25 mg/ml, corrispondenti di fatto alla concentrazione minima di aglio valutata nella sperimentazione, mentre Gull et al. (2012), che hanno valutato anche concentrazioni inferiori, hanno invece ottenuto per i batteri testati concentrazioni di MIC variabili tra 0,02 e 0,2 mg/ml. Uno studio più ampio, condotto su 25 ceppi rispettivamente di *E. coli* e *S. aureus* analizzati in concentrazioni batteriche pari a 10^7 UFC e mediante diluizioni seriali in brodo, i valori di MIC sono risultati compresi tra 4 mg/ml e 8 mg/ml per entrambi i germi (Yadav et al., 2015).

Altri fattori che possono influenzare la divergenza di valori ottenuti in ricerche diverse sono rappresentati dall'instabilità dell'allicina, principio attivo responsabile dell'attività antimicrobica (Belguith et al., 2010), dalla forma fisica di aglio utilizza-

to, ad esempio fresco o essiccato, e nel caso di utilizzo di un estratto, dalla tipologia e dalla modalità di preparazione. Prove comparative con estratti di aglio, acquoso, alcolico in etanolo, alcolico in metanolo, hanno evidenziato una migliore efficacia dell'estratto acquoso rispetto a quelli alcolici, la cui efficacia risultava tra loro sovrapponibile (Gull et al., 2012), ma anche variabile a seconda del germe testato (Mohsenipour e Hassanshahian, 2015).

L'efficacia antimicrobica delle sostanze naturali potrebbe essere potenziata dalla loro associazione (Bag e Chattopadhyay, 2015). Ad esempio, timo, menta piperita, salvia, pepe nero e aglio, sembrano avere *in vitro* un effetto antimicrobico maggiore nei confronti di *Bacillus subtilis* e *Salmonella* Enteritidis, se testati in sinergismo piuttosto che singolarmente (Al-Turki, 2007), anche se Anduaem (2013) non ha evidenziato un reale potenziamento di efficacia dell'aglio se associato al miele.

Prove di campo effettuate su gruppi di tacchini hanno evidenziato un'efficacia di una miscela, composta da acidi organici (acido acetico, formico e propionico), e di aldeide cinnamica, estratto della cannella, aggiunta al mangime in concentrazione pari allo 0,2 %, nel ridurre la concentrazione intestinale di *E. coli* e nel limitare le lesioni indotte da un ceppo 078 antibiotico resistente (Parigi et al., 2017).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio sono piuttosto incoraggianti. Tuttavia, ulteriori valutazioni su un numero più ampio di ceppi e su un'eventuale associazione dell'aglio con altre sostanze naturali sono auspicabili per poter valutare una eventuale applicabilità di un suo utilizzo in campo. In particolare, l'associazione con altre sostanze naturali potrebbe comportare il vantaggio di limitare i quantitativi di aglio da somministrare agli animali, riducendo l'eventuale rischio di trasmissione di odori sgradevoli al mangime e ai prodotti derivati, uova o carne.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Turki AI. (2007). Antibacterial effect of thyme, peppermint, sage, black pepper, and garlic hydrosols against *Bacillus subtilis* and *Salmonella enteritidis*. *J. Food. Agric. Environ.* 5: 92-94.
2. Anduaem B. (2013). Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 3: 725-731.
3. Babinska I, Kleczek K, Szarek J and W Makowski. (2012). Modulating effect of propolis and bee pollen on chicken breeding parameters and pathomorphology of liver and kidneys in the course of natural infection with *Salmonella enteritidis*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 56: 3-8.
4. Bag A and RR Chattopadhyay. (2015). Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLOSone.* 10: e0131321.
5. Belguith H, Kthiri F, Chati A, Abu Sofah A, Ben Hamida J and A Landoulsi. (2010). Study of the effect of aqueous garlic extract (*Allium sativum*) on some *Salmonella* serovars isolates. *Emir. J. Food Agric.* 22: 189-206.
6. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK and U Bandyopadhyay. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *India. Current. Sci.* 82:11.

7. Camarda A, Pugliese N, Bevilacqua A, Circella E, Gradoni L, George D, Spargano O and A Giangaspero. (2018). Efficacy of a novel neem oil formulation (RP03™) to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* 32: 290-297.
8. CLSI (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard, 7th Ed. - CLSI document M7-A7. Clinical Laboratory Standard Institute; Wayne PA, USA.
9. Fani MM and J Kohanteb. (2012). Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J. Oral. Sci.* 54: 15-21.
10. Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam S, Samra Z and A Athar. (2012). Inhibitory effect of allium satibum and Zingiber officinale extracts on clinically Important drug resistant pathogenic bacteria. *Ann. Clinn. Microbiol. Antimicrob.* 11:8.
11. Ibrahim SA, Dharmavavaram SR, Seo CW and G Shahbazi. (2004). Antimicrobial activity of Bididobacterium Longum (NCFB2259) as influenced by spices. *Internet. J. Food. Safet.* 2: 6-8.
12. Jain I, Jain P, Bisht D, Sharma A, Srivastava B and N Gupta. (2015). Comparative Evaluation of Antibacterial Efficacy of Six Indian Plant Extracts against *Streptococcus Mutans*. *J. Clin. Diagnostic. Res.* 9: zc50-zc53.
13. Jeong SH, Song W, Bae IK , Kim HS and MJ Park. (2014). Broth microdilution methods using B-lactamase inhibitors for the identification of Klebsiella pneumonia carbapenemases and metallo –beta-lactamases in Gram- negative bacilli. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 44: 49-55.
14. Mohsenipour Z and M Hassanshahian. (2015). The effects of Allium sativum Extracts on Biofilm Formationn and Activities of Six Pathogenic Bacteria. *Jundishapur. J. Microbiol.* 8: e18971.
15. Parigi M, Massi P, Fiorentini L, Tosi G, Romboli C, Vandi L, Bocciero R and G Fregnani. (2017). Valutazione dell'efficacia di una miscela di acidi organici e fitoterapici nel controllo dell'infezione da *Escherichia coli* nel tacchino. *Atti II° simposio scientifico SIPA. Parma 22 Settembre 2017.*
16. Sampedro M, Artola R, Murature M, Murature D, Ditamo Yand G Roth. (2004). Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. *Int Immunopharmacol.* 4: 411-418.
17. Tassou CC, Drosinos EH and GJE Nychas. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4° and 10°C. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 593-600.
18. Yadav S, Trivedi NA and JD Bhatt. (2015). Antimicrobial activity of fresh garlic juice: an in vitro study. *A.Y.U.* 36: 203-206.



EFFETTI DELLE PROFILASSI ANTIMICROBICHE SUL MICROBIOTA INTESTINALE E SULLA BARRIERA INTESTINALE IN POLLI BROILER

Cuccato M.¹, Scaglione F. E.¹, Pregel P.¹, Laconi A.², Perona G.¹, Nurisso S.¹, Sereno A.¹, Divari S.¹, Piccirillo A.², Cannizzo F. T.¹

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

² *Dipartimento di Biomedicina comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD).*

Summary

The intestinal barrier is a complex system that allows the protection of the gut, preventing systemic diseases, and ensuring optimal agricultural productivity. To date, in the poultry industry, concerns have been raised about antimicrobial use and antimicrobial resistance. However, antimicrobials can play a role in the modulation of the intestinal barrier and, in particular, of the gut microbiota. Alteration of normal homeostasis of this barrier can induce arousal of an inflammatory state with intestinal symptoms and lesions. This study aimed mainly to describe the consequences of prophylactic and therapeutic antimicrobial use in modulating the intestinal barrier. The intestinal contents of the ileum and caecum were investigated by 16S rRNA gene sequencing and the intestinal tissues were analyzed using a histopathological scoring system. Our results show that the diversity metrics of microbial communities were affected by the use of antimicrobials. Furthermore, the genera *Campylobacter* spp. was particularly abundant in ileal samples, suggesting a possible risk to human public health. Histopathological evaluations showed that the treated animals presented several lesions, such as epithelial detachment, villi fusion, mucosal necrosis and the presence of lymphocytic and eosinophilic infiltrates in the mucosa and submucosa of the ileum, caecum and colon. Finally, this study suggests a possible role for antimicrobials in the modulation of the different components of the intestinal barrier, and further studies are needed to better clarify their involvement.

INTRODUZIONE

Il corretto funzionamento della barriera intestinale nel pollo da carne è di notevole importanza per garantire la crescita in salute dell'animale (Dal Pont et al., 2020). Questa complessa barriera è responsabile della difesa dell'intestino ed è composta da microbiota intestinale, enterociti e immunità mucosale (Pawłowska and Sobieszcańska, 2017; Iacob and Iacob, 2019). Disordini gastroenterici possono alterare la barriera intestinale ed avere conseguenze negative sulle performance produttive, il benessere animale e la mortalità (Dal Pont et al., 2020; Tabler et al., 2020). Inoltre, è stato recentemente chiarito che l'alterazione dell'omeostasi intestinale può attivare a cascata i *pathway* capaci di innescare uno stato infiammatorio (Dal Pont et al., 2020). Il microbiota intestinale costituisce la prima linea di difesa della barriera intestinale ed è costituito da una complessa comunità microbica, in rapporto di simbiosi con il proprio ospite (Kers et al., 2018; Iacob and Iacob, 2019; Le Roy et al., 2019). Infatti, il microbiota intestinale può influenzare diverse funzioni dell'ospite, tra cui la digestione delle sostanze nutrienti, l'immunità e il metabolismo (Xiao et al., 2017). L'impiego di sostanze antimicrobiche (AM) in allevamento può alterare la composizione del microbiota e di conseguenza influire sulla salute

intestinale (Xiong et al., 2018). In questi anni si è riscontrata crescente preoccupazione nei confronti dell'utilizzo degli AM negli allevamenti animali, a causa del preoccupante aumento nell'uomo di infezioni mediate da patogeni resistenti (Mehdi et al., 2018). Tuttavia, l'utilizzo di AM può avere conseguenze dirette sugli animali allevati e in particolare sul microbiota intestinale causando disbiosi (Yu et al., 2017; Zhang et al., 2017) e conseguente calo della risposta immunitaria e perdita della permeabilità e integrità intestinale (Jacob and Jacob, 2019). Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare gli effetti di diversi protocolli di profilassi antimicrobica sul microbiota e sulla barriera intestinale dei polli broiler. A tale scopo le comunità microbiche di ileo e cieco sono state analizzate mediante la tecnica di sequenziamento *16S rRNA gene*. Gli effetti dei trattamenti sulla barriera intestinale sono stati valutati mediante istopatologia con l'ausilio di uno *scoring system*.

MATERIALI E METODI

Prova zootecnica

Nel 2019 presso l'azienda avicola del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino sono stati allevati 120 broiler (Ross 308). Gli animali sono stati acquistati da un incubatoio locale, dove hanno ricevuto la vaccinazione *in ovo* contro la malattia di Marek e di Gumboro. Inoltre, alla schiusa sono stati vaccinati contro la coccidiosi (*coarse spray*; Hypracox, Amer, Spain), la malattia di Newcastle e la bronchite infettiva (*fine spray*). I pulcini sono stati divisi in 6 gruppi al momento dell'accasamento. Ogni gruppo aveva a disposizione acqua e mangime *ad libitum*. Le condizioni di allevamento (programma luce, temperatura, umidità relativa e ventilazione) sono state controllate secondo le linee guida di allevamento del pollo da carne Ross 308. Dal giorno di accasamento al 12° giorno di allevamento gli animali sono stati alimentati con una dieta di avviamento, successivamente fino al giorno prima della macellazione (46° giorno) con una dieta di accrescimento. La dieta di accrescimento era addizionata con diclazuril, un coccidiostatico, alla concentrazione finale di 1 mg/kg. Durante il ciclo produttivo, 5 gruppi hanno ricevuto diversi protocolli di profilassi antimicrobica con amoxicillina (AMX1 e AMX2), tiamfenicolo (THP1 e THP2) e trimetoprim-sulfadiazina (TRIM). Il sesto gruppo, impiegato come controllo, non ha ricevuto alcun trattamento (K). In seguito a comparsa di sintomatologia intestinale e respiratoria, tutti gli animali sono stati trattati con doxiciclina a dose terapeutica (20 mg/kg P.V. SID) dal 33° al 37° giorno di allevamento. I diversi protocolli di trattamento applicati sono descritti in dettaglio in Tabella 1.

Tabella 1. Protocolli di profilassi antimicrobica applicati nel corso della prova zootecnica.

Gruppo	Molecola	Nome commerciale	Dose	Giorni di somministrazione
AMX1	Amoxicillina	Supramox	20 mg/kg P.V. BID	4-5-6
THP1	Tiamfenicolo	Tisan	67 mg/kg P.V. SID	4-5-6
AMX1	Amoxicillina	Supramox	20 mg/kg P.V. BID	21-22-23
AMX2	Tiamfenicolo	Tirsan	67 mg/kg P.V. SID	21-22-23
TRIM	Trimetoprim + sulfadiazina	Trimetosulfa	20 + 4 mg/kg P.V. SID	21-22-23-24-25
K		-	-	-

Macellazione e prelievo dei campioni

Dal momento che sono stati rispettati i tempi di sospensione delle molecole antimicrobiche somministrate e in seguito alla remissione della sintomatologia sopra riportata, i broiler sono stati regolarmente macellati in seguito a stordimento e iugulazione presso un macello locale. Dopo la visita *post mortem* del veterinario ufficiale, i campioni tissutali di ileo, cieco e colon sono stati raccolti e fissati in formalina 10% e i contenuti intestinali di ileo e cieco sono stati campionati in condizioni asettiche e congelati a -80° C.

Estrazione del DNA e sequenziamento

Sei animali per ogni gruppo di trattamento sono stati casualmente selezionati e il rispettivo contenuto intestinale dei tratti ileo e cieco è stato analizzato (72 campioni totali). Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit *Maxwell RSC Fecal Microbiome DNA Kit* (Promega). La quantità e la qualità del DNA estratto sono state determinate utilizzando il kit *QuantiFluor dsDNA System* (Promega) e il *Nanodrop spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). La preparazione delle librerie e il sequenziamento del *16S rRNA gene* sono state condotte presso un laboratorio esterno. Le regioni ipervariabili V3 e V4 del gene codificante per il 16S rRNA sono state amplificate utilizzando i primer universali 341F (CCTACGGGNGBCASCAG) e 805R (GACTACNVGGGTATCTAATCC). Per la preparazione delle librerie è stato utilizzato il *Nextera XT Index kit* (Illumina) e il sequenziamento è stato condotto con MiSeq con protocollo 2 x 300 bp *paired-end*.

Analisi delle sequenze

Le sequenze grezze sono state analizzate separatamente per i due tratti intestinali (ileo e cieco) con lo stesso protocollo bioinformatico. La qualità delle sequenze è stata controllata con il software FastQC v. 0.11.9. Successivamente l'analisi è stata condotta con Qiime2 v. 2021.4 (Caporaso et al., 2010), utilizzando la stessa pipeline descritta in un precedente lavoro (Cuccato et al., 2021). Brevemente, in seguito alla rimozione dei primer di sequenziamento le sequenze sono state classificate in *amplicon sequence variant* (ASV) e utilizzate nell'analisi di *alpha* e *beta diversity* delle comunità microbiche. Infine, la tassonomia è stata assegnata sulla base del database *Greengenes* al 99% d'identità.

Valutazione istopatologica

Dagli stessi animali selezionati per l'analisi del microbiota intestinale è stata condotta una valutazione istopatologica dei tessuti di ileo, cieco e colon. I campioni sono stati sezionati a 4 µm di spessore e colorati con Ematossilina-Eosina (HE). I preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico (Nikon Eclipse E600, Nikon), e le alterazioni sono state registrate seguendo uno *scoring system*, applicato precedentemente e opportunamente modificato per le caratteristiche del pollo da carne (Ruggeri et al., 2014). Sono state registrate le seguenti alterazioni: lesioni a carico dei villi e dell'epitelio intestinale, infiltrato infiammatorio a carico della mucosa e sottomucosa, attivazione delle tonsille cecali e presenza di congestione e/o emorragie. Diversi *score* numerici sono stati attribuiti alle specifiche lesioni secondo lo schema riportato in Tabella 2.

Tabella 2. *Scoring system* per la valutazione istopatologica dei tessuti intestinali del pollo da carne.

	Lesione/Tipo	Gravità	Distribuzione
Villi – Epitelio	1 – 2 – 3 (disepitelizzazione - fusione dei villi - necrosi)	1 – 2 – 3 (lieve - moderato - grave)	1 – 2 – 3 (focale - disseminato - diffuso)
Infiltrato infiammatorio	Linfocitario/eosinofilico	1 – 2 – 3	1 – 2 – 3
Congestione	+/- (presente/assente)		
Emorragie	-	1 – 2 – 3	1 – 2 – 3

Analisi statistiche

Gli score totali ottenuti durante la valutazione istopatologica sono stati analizzati mediante test di Kolmogorov-Smirnov per valutarne la normalità di popolazione e successivamente analizzati con test ANOVA o Kruskal-Wallis, seguiti da Dunn's post test. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate in GraphPad Prism v.9. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$. Per quanto riguarda le analisi statistiche relative al microbiota intestinale, esse sono state condotte attraverso i test di Kruskal-Wallis (*alpha-diversity*) e PERMANOVA (*beta-diversity*) integrati nella pipeline di Qiime2.

RISULTATI

Microbiota intestinale

Dall'analisi delle sequenze del 16S batterico del microbiota intestinale di ileo e cieco è emerso che l'*alpha-diversity* delle comunità microbiche presentava significatività statistica solo per l'*evenness index* (ileo p -value $< 0,001$ – cieco p -value $< 0,006$). Invece, non sono state riscontrate differenze significative per il *faith index* (ileo p -value = 0,13 – cieco p -value = 0,48). Per quanto riguarda la *beta-diversity*, il test PERMANOVA ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra le diverse comunità batteriche del cieco nei diversi gruppi di trattamento (p -value $< 0,001$), ma nei campioni di ileo lo stesso test è risultato non significativo (p -value 0,056). Infine, i risultati della tassonomia hanno rilevato che nell'ileo i *phyla* principali sono in ordine di abbondanza *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, mentre nel cieco *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. È stata rilevata in 20 campioni su 36 una presenza superiore al 10% di batteri appartenenti al genere *Campylobacter*.

Istopatologia

Dal punto di vista istopatologico, sono state rilevate lesioni a carico dei villi e dell'epitelio intestinale, tra cui disepitelizzazione, fusione dei villi e necrosi. Inoltre, è stata rilevata la presenza di infiltrato infiammatorio di tipo linfocitario e in parte anche eosinofilico a carico di mucosa e sottomucosa di ileo, cieco e colon. Congestione vasale e presenza di emorragie mucosali apicali sono state rilevate nei diversi tratti esaminati. L'analisi statistica condotta ha rilevato alcune differenze statisticamente significative rispetto al gruppo K: nello score totale dell'infiltrato linfocitario muco-

sale di colon ($p\text{-value} = 0,0383$). In particolare, secondo il Dunn's post test l'infiltrato linfocitario a carico della mucosa del colon era statisticamente significativo nel gruppo AMX1 ($p\text{-value} = 0,018$).

DISCUSSIONE

Nel presente studio è emerso che il microbiota intestinale di ileo e cieco nei *broiler* è stato influenzato dal trattamento di profilassi antimicrobica in termini sia di quantità di batteri sia di diversità delle comunità microbiche. Infatti, l'*evenness index* presenta significatività statistica sia nell'ileo sia nel cieco. Invece, la *beta-diversity* ha mostrato di essere significativamente differente tra i diversi gruppi di trattamento nel cieco e non nell'ileo, dove si è riscontrata solo una tendenza alla significatività ($p\text{-value} = 0,056$). Questi risultati sono solo parzialmente in accordo con uno studio precedente condotto sul microbiota intestinale di *broiler* trattati con profilassi antimicrobiche (Cuccato et al., 2021). La comparsa di sintomatologia intestinale e il trattamento con doxiciclina somministrato a tutti gli animali potrebbero aver alterato la composizione del microbiota intestinale e potrebbe verosimilmente essere la causa delle differenze riscontrate rispetto allo studio precedente. Per quanto riguarda i risultati della tassonomia, il *phylum Firmicutes* risulta essere il più abbondante in tutti i campioni di ileo e cieco. Batteri appartenenti a questo *phylum* sono i principali colonizzatori del piccolo intestino dei polli da carne (Yeoman et al., 2012). Invece, in letteratura sono presenti risultati contrastanti su quale sia il *phylum* principale del cieco: *Firmicutes* (Yeoman et al., 2012) o *Bacteroidetes* (Xiao et al., 2017). Infine, la presenza cospicua di batteri appartenenti al genere *Campylobacter* spp. rappresenta un dato di interesse, dal momento che normalmente in polli sani tali microrganismi sono presenti sporadicamente (Awad et al., 2018; Sood et al., 2020). Inoltre, alcune specie di *Campylobacter* spp. costituiscono un rischio per la salute umana, essendo patogeni responsabili di zoonosi (Stanley et al., 2014; Awad et al., 2018; Sood et al., 2020). Dal punto di vista istopatologico sono state rilevate lesioni a carico dei villi e dell'epitelio di ileo, cieco e colon, così come la presenza di infiltrato linfocitario ed eosinofilo. L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative tra i diversi gruppi di trattamento. La sintomatologia intestinale era presente in tutti i gruppi e trova conferma nei reperti istopatologici di necrosi a carico del cieco, disepitelizzazione, fusione dei villi, emorragie apicali e infiltrato infiammatorio. Alterazioni della barriera intestinale quali quelle riscontrate nel presente studio, sia nella composizione del microbiota intestinale sia dello stato dei tessuti intestinali, possono inficiare la salute e produttività dei polli da carne, nonché il benessere animale (Dal Pont et al., 2020; Tabler et al., 2020).

CONCLUSIONI

In conclusione, il presente studio mette in luce un possibile ruolo dei trattamenti antimicrobici nella modulazione delle diverse componenti della barriera intestinale del pollo da carne. La presenza cospicua di batteri appartenenti al genere *Campylobacter* spp. sottolinea la necessità di una particolare attenzione alla salute pubblica, non solo animale. I dati in nostro possesso non rendono possibile dimostrare che il trattamento di profilassi antimicrobica possa aver influito sulla comparsa della sintomatologia intestinale e sull'aggravamento della disbiosi e delle lesioni a

carico dei diversi tratti intestinali, tuttavia, gli antimicrobici sono considerati uno dei principali fattori di alterazione del microbiota intestinale con conseguenze sulla barriera intestinale e sull'ospite (Lauridsen, 2019; Kogut et al., 2020), pertanto ulteriori approfondimenti sarebbero opportuni.

BIBLIOGRAFIA

1. Awad, W. A., C. Hess, and M. Hess. 2018. Re-thinking the chicken-Campylobacter jejuni interaction: a review. *Avian Pathol.* 47:352–363.
2. Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. Gonzalez Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, and R. Knight. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
3. Cuccato, M., S. Rubiola, D. Giannuzzi, E. Grego, P. Pregel, S. Divari, and F. T. Cannizzo. 2021. 16S rRNA sequencing analysis of the gut microbiota in broiler chickens prophylactically administered with antimicrobial agents. *Antibiotics* 10:1–10.
4. Dal Pont, G. C., M. Farnell, Y. Farnell, and M. H. Kogut. 2020. Dietary factors as triggers of low-grade chronic intestinal inflammation in poultry. *Microorganisms* 8:139.
5. Iacob, S., and D. G. Iacob. 2019. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Front. Microbiol.* 10:1–17.
6. Kers, J. G., F. C. Velkers, E. A. J. Fischer, G. D. A. Hermes, J. A. Stegeman, and H. Smidt. 2018. Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Front. Microbiol.* 9:235.
7. Kogut, M. H., A. Lee, and E. Santin. 2020. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult. Sci.* 99:1906–1913.
8. Lauridsen, C. 2019. From oxidative stress to inflammation: Redox balance and immune system. Pages 4240–4246 in *Poultry Science*. Oxford University Press.
9. Mehdi, Y., M. P. Létourneau-Montminy, M. Lou Gaucher, Y. Chorfi, G. Suresh, T. Rouissi, S. K. Brar, C. Côté, A. A. Ramirez, and S. Godbout. 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim. Nutr.* 4:170–178.
10. Pawłowska, B., and B. M. Sobieszcząńska. 2017. Intestinal epithelial barrier: The target for pathogenic *Escherichia coli*. *Adv. Clin. Exp. Med.* 26:1437–1445.
11. Le Roy, C. I., M. J. Woodward, R. J. Ellis, R. M. La Ragione, and S. P. Claus. 2019. Antibiotic treatment triggers gut dysbiosis and modulates metabolism in a chicken model of gastro-intestinal infection. *BMC Vet. Res.* 15:1–13.
12. Ruggeri, J., M. Pesciaroli, B. Gaetarelli, F. E. Scaglione, P. Pregel, S. Ammendola, A. Battistoni, E. Bollo, G. L. Alborali, and P. Pasquali. 2014. Parenteral administration of attenuated *Salmonella Typhimurium* Δ znuABC is protective against salmonellosis in piglets. *Vaccine* 32:4032–4038.
13. Sood, U., V. Gupta, R. Kumar, S. Lal, D. Fawcett, S. Rattan, G. E. J. Poinern, and R. Lal. 2020. Chicken Gut Microbiome and Human Health: Past Scenarios, Current Perspectives, and Futuristic Applications. *Indian J. Microbiol.* 60:2–11.

14. Stanley, D., R. J. Hughes, and R. J. Moore. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:4301–4310.
15. Tabler, T. W., E. S. Greene, S. K. Orłowski, J. Z. Hiltz, N. B. Anthony, and S. Dridi. 2020. Intestinal Barrier Integrity in Heat-Stressed Modern Broilers and Their Ancestor Wild Jungle Fowl. *Front. Vet. Sci.* 7:249.
16. Xiao, Y., Y. Xiang, W. Zhou, J. Chen, K. Li, and H. Yang. 2017. Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poult. Sci.* 96:1387–1393.
17. Xiong, W., Y. Wang, Y. Sun, L. Ma, Q. Zeng, X. Jiang, A. Li, Z. Zeng, and T. Zhang. 2018. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome* 6:1–11.
18. Yeoman, C. J., N. Chia, P. Jeraldo, M. Sipos, N. D. Goldenfeld, and B. A. White. 2012. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim. Health Res. Rev.* 13:89–99.
19. Yu, K., C. Mu, Y. Yang, Y. Su, and W. Zhu. 2017. Segment-specific responses of intestinal epithelium transcriptome to in-feed antibiotics in pigs. *Physiol. Genomics* 49:582–591.
20. Zhang, D., T. Shang, Y. Huang, S. Wang, H. Liu, J. Wang, Y. Wang, H. Ji, and R. Zhang. 2017. Gene expression profile changes in the jejunum of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic. *Sci. Rep.* 7:1–10.



DALL'EST ALL'OVEST: RICOSTRUZIONE FILODINAMICA DELLA STORIA DELLA VARIANTE 2 DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Franzo G.¹, Legnardi M.¹, Grassi L.¹, Houta M. H.², Hassan K. E.², Tucciarone C.M.¹, Abdel-Moneim A.S.³, El-Sawah A.A.², Ali A.², Cecchinato M.¹

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

²*Poultry Diseases Department, Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, Beni-Suef 62511, Egypt;*

³*Microbiology Department, Virology Division, College of Medicine, Taif University, Taif, Saudi Arabia.*

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is one of the main infectious agents affecting the avian industry. The remarkable evolutionary rate of this virus represents an often-insurmountable challenge to its control, leading to the emergence of different lineages featured by different biological properties and limited cross-protection. In the present study, the origin, spreading and evolution of GI-23, one of the most important IBV emerging lineages, has been reconstructed using a phylodynamic approach. To this purpose, the broadest available collection of complete and partial S1 sequences was downloaded from GenBank and merged with specifically sequenced European strains. After a likely ancient origin, GI-23 circulated undetected in the Middle East for a considerable time, thereafter emerging as a threat in parallel with the intensification of the poultry industry and its introduction in other countries. An intensive viral circulation affecting mainly neighbouring countries or those with strong economic and political relationships was demonstrated, even though some nations appear to play a major role as a “bridge” among less related locations. Of note, a big recombinant cluster, likely originating in the Middle East but spreading thereafter, especially to Europe through Turkey, demonstrated a much-marked increase in viral population size, and potentially fitness, compared to previously circulating variants.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva (IBV) è attualmente classificato nella specie *Avian coronavirus*, genere *Gammacoronavirus*, famiglia *Coronaviridae* [1]. Presenta un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva di circa 27kb con la seguente organizzazione: 5'UTR-ORF1a/b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b-3'UTR. Il gene S, codificante per la proteina *Spike*, è largamente il più studiato. Tale proteina infatti gioca un ruolo fondamentale nella biologia del virus, mediandone l'adesione e la fusione alle cellule dell'ospite, oltre a rappresentare il principale target della risposta anticorpale neutralizzante. In aggiunta, in funzione della sua notevole variabilità genetica, si presta all'esecuzione di studi di epidemiologia molecolare nonché alla classificazione dei diversi ceppi [2,3]. A partire dalla sua prima identificazione negli anni 30, IBV è stato identificato a livello mondiale, rivelando una ragguardevole variabilità genetica e fenotipica, dovuta al rapido tasso di mutazione (10^{-3} - 10^{-5} sostituzioni/sito/anno) e ricombinazione che lo carat-

terizza [2,4,5]. Ciò ha portato all'emergere di diversi stipiti contraddistinti da differenti caratteristiche biologiche e spesso scarsa cross-protezione. Tra i criteri di classificazione introdotti nel tempo, quello attualmente più utilizzato si basa sull'analisi filogenetica e delle distanze genetiche della porzione S1 del gene S. Sulla base di questo schema sono attualmente riconosciuti 8 genotipi (da GI a GIII), a loro volta suddivisi in lineaggi [3]. Il lineaggio GI-23, anche noto come Variante2, è attualmente uno dei più diffusi e rilevanti. Inizialmente descritto in Medioriente circa 2 decenni fa, si è diffuso in diverse altre regioni inclusa dell'Africa, Asia ed Europa [6]. Nonostante la rilevanza di questa variante e le preoccupazioni che ha suscitato fra allevatori e veterinari, non sono ad oggi disponibili analisi formali volte a ricostruirne l'origine, l'evoluzione e i pattern di diffusione. Le analisi filodinamiche, combinando diversi approcci statistici, possono essere utilizzate per comprendere come la storia, l'evoluzione e l'epidemiologia di un virus ne plasmino, di fatto, il genoma e quindi la filogenesi. In questo modo, dallo studio delle sequenze virali è possibile ricostruire diversi parametri e aspetti che hanno caratterizzato la popolazione virale nel corso del tempo. In particolare, in questo studio è stata effettuata un'approfondita analisi mirata a studiare l'epidemiologia, i pattern di evoluzione e ricombinazione, le dinamiche di popolazione e le vie di diffusione del GI-23. Il ruolo della gestione degli animali, delle strategie di controllo e fattori socio-economici sono stati inoltre considerati per valutarne il potenziale impatto nella storia di questo virus.

MATERIALI E METODI

Sequenze europee

Lo studio ha preso in considerazione campioni inviati da diversi stati europei a fini diagnostici presso il laboratorio di malattie infettive veterinarie del dipartimento MAPS e costituiti in massima parte da pool di tamponi tracheali. La diagnosi di infezione e la caratterizzazione preliminare dei ceppi è stata effettuata tramite amplificazione e sequenziamento della terza regione ipervariabile (HVR3) del gene S1 utilizzando i primer XCE1 e XCE2 [7]. Una classificazione preliminare è stata effettuata confrontando le sequenze ottenute con il database di riferimento proposto da Valastro et al. [3]. Per tutti gli stipiti classificati come GI-23 si è cercato di sequenziare l'intera regione S1 utilizzando coppie di primer e un protocollo appositamente validato. Tutte le sequenze ottenute e i metadati ad esse associate sono state depositate in GenBank (Acc.Number MZ666004-MZ666086).

Dataset di sequenze internazionali

Tutte le sequenze del gene S1 di IBV, per le quali fosse disponibile il paese e la data di campionamento, sono state scaricate da Genbank e allineate alle sequenze di riferimento proposte da Valastro et al. [3] utilizzando MAFFT [8]. Un albero filogenetico è stato ricostruito utilizzando IQ-Tree [9] e le sequenze clusterizzate con le referenze del genotipo GI-23 sono state selezionate e incluse nelle successive analisi. Inoltre, al fine di aumentare il numero e la rappresentatività delle sequenze utilizzate, sono stati creati dei dataset accessori che includevano tutte le sequenze disponibili delle regioni ipervariabili HVR1/2 e HVR3, classificate nel lineaggio GI-23 utilizzando l'approccio precedentemente descritto. Le sequenze ottenute a livello europeo, assieme a quelle di vaccini basati sul GI-23 attualmente disponibili, sono state integrate in questo dataset. Un'ulteriore analisi filogenetica è stata eseguita per identificare ed escludere tutte le sequenze che presentavano un chiaro clustering con quelle vaccinali.

Analisi di ricombinazione

I dataset ottenuti sono stati testati per valutare la presenza di fenomeni di ricombinazione utilizzando il software RDP4 [10], ottimizzando i parametri di analisi sulla base delle caratteristiche del dataset in esame. Sono stati accettati solo gli eventi di ricombinazione rilevati da almeno 3 dei metodi statistici implementati nel software aventi una significatività pari a $p\text{-value} < 10^{-5}$. Infine, la presenza di residue evidenze di ricombinazione e la localizzazione dei breakpoint è stata confermata usando GARD [11].

Analisi filodinamica

I dataset, in assenza di residue evidenze di ricombinazione, sono stati analizzati mediante l'approccio Bayesiano alla coalescente seriale implementato in BEAST [12] al fine di stimare diversi parametri di popolazione quali il time to most recent common ancestor (tMRCA), il tasso evolutivo e le dinamiche della popolazione virale. Un'analisi filogeografica è stata effettuata considerando la nazione di campionamento di ciascun ceppo come tratto discreto, al fine di ricostruire la migrazione virale nel corso del tempo, come descritto da Lemey et al., (2009) [13]. Per ogni dataset sono state condotte 3 simulazioni di 200 milioni di generazioni che sono poi state unite in un unico file utilizzando logcombiner. La qualità e robustezza dei risultati ottenuti sono state analizzate e riassunte con Tracer 1.6. Le stime ottenute sono state riassunte in termini di media e 95% High Posterior Probability (95HPD). Similmente, è stato ottenuto un Maximum clade credibility tree (MCC), sulla base di tutti gli alberi generati nel corso delle simulazioni. Il software SpreadD3 è stato utilizzato per graficare il processo di diffusione virale nello spazio e nel tempo e per valutare le connessioni fra stati caratterizzate da un adeguato supporto statistico (i.e. Bayesian Factor >10). Ulteriori statistiche riassuntive e grafici sono stati generati in R.

RISULTATI

Analisi di ricombinazione e dataset di lavoro

Un totale di 231 sequenze complete del gene S1, 270 dell'HVR1/2 e 341 dell'HVR3, rappresentative rispettivamente di 8, 12 e 14 stati, sono state incluse nello studio.

Il dataset comprendente le sequenze complete di S1 ha dimostrato significative evidenze di ricombinazione, e un breakpoint in posizione 780 dell'allineamento è stato identificato sia con RDP che con GARD. Evidenze di ricombinazione non sono state invece riscontrate per le regioni HVR1/2 e HVR3.

Conseguentemente, per poter eseguire le successive analisi, l'allineamento basato sul gene S1 è stato suddiviso in 2 nuovi allineamenti sulla base di questo breakpoint che sono poi stati analizzati in modo indipendente. Tali analisi hanno permesso inoltre di evidenziare un numeroso gruppo di ceppi ricombinanti che includeva principalmente, sebbene non esclusivamente, stipiti Europei. Entrambi i ceppi parentali facevano parte di cluster che includevano essenzialmente sequenze di origine egiziana. Considerata la potenziale rilevanza epidemiologica ed evolutiva di questo evento di ricombinazione, è stato creato un dataset dedicato che includesse tutti questi ceppi ricombinanti.

In definitiva, sono stati analizzati i seguenti database di sequenze:

- a) Regione N-terminale del gene S1
- b) Regione C-terminale del gene S1
- c) Cluster ricombinante
- d) HVR1/2
- e) HVR3

Analisi filodinamica

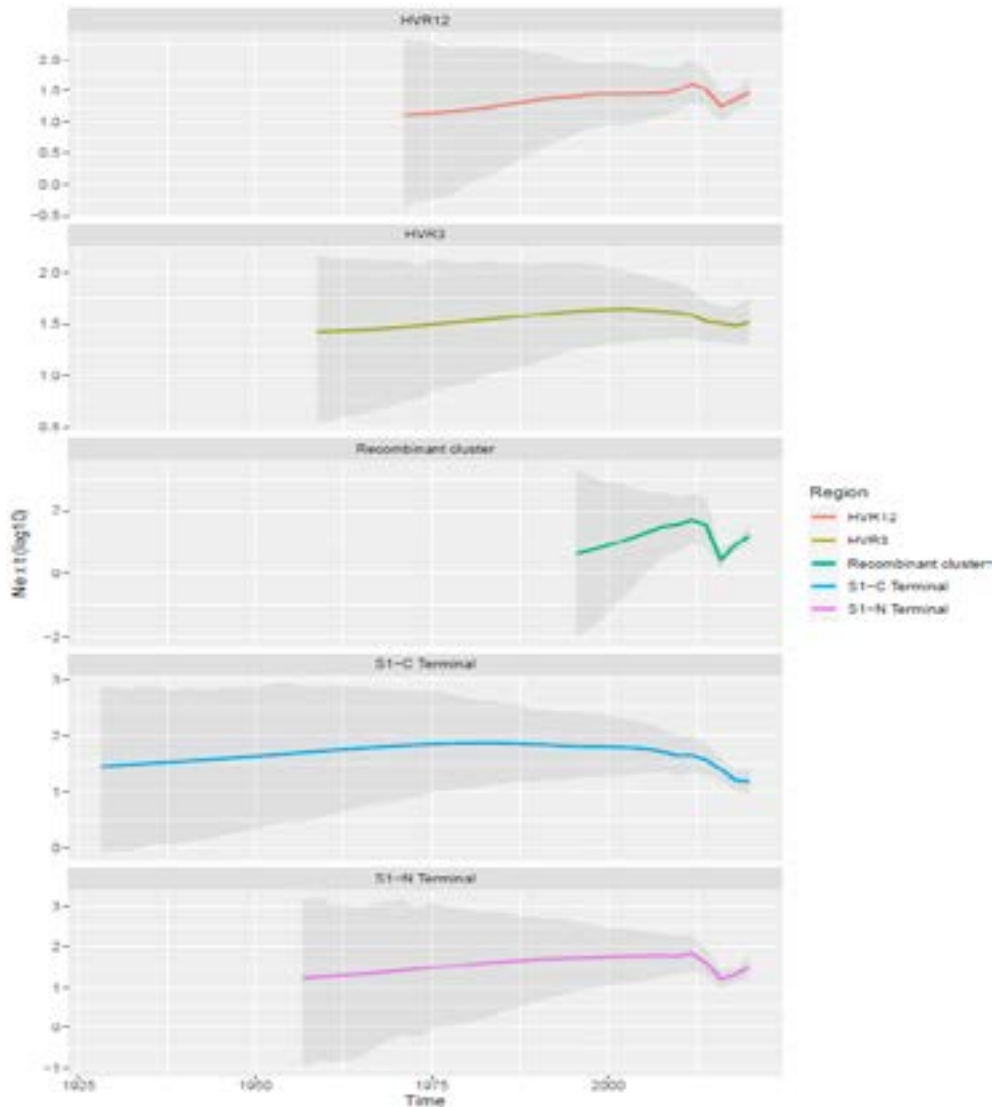
La stima dei principali parametri di popolazione ottenuta dall'analisi dei diversi dataset è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Riassunto delle principali caratteristiche dei dataset analizzati e delle stime dei parametri di popolazione.

Data-base	Regione	Numero di sequenze	Anni	Numero di stati	tMRCA (Anni)			Origine			Tasso evolutivo		
					Media	Lower 95HPD	Higher 95HPD	Media	Lower 95HPD	Higher 95HPD	Media	Lower 95HPD	Higher 95HPD
A	SI-N terminale	231	1998-2020	8	58,737	43,828	81,972	1961,263	1938,028	1976,172	3,05·10 ⁻³	2,54·10 ⁻³	3,69·10 ⁻³
B	SI-C terminale	231	1998-2020	8	86,13	64,25	120,229	1933,87	1899,771	1955,75	1,48·10 ⁻³	1,23·10 ⁻³	1,78·10 ⁻³
C	Cluster ricombinante	188	2006-2020	6	23,618	19,008	31,081	1996,382	1988,919	2000,992	1,77·10 ⁻³	2,13·10 ⁻³	2,60·10 ⁻³
D	HVR1/2	270	1996-2020	12	57,942	45,787	75,2	1962,058	1944,8	1974,213	6,02·10 ⁻³	4,96·10 ⁻³	7,33·10 ⁻³
E	HVR3	341	1998-2020	14	46,622	37,628	61,372	1973,378	1958,628	1982,372	1,90·10 ⁻³	2,30·10 ⁻³	2,81·10 ⁻³

La valutazione delle dinamiche di popolazione nel corso del tempo ha rivelato dei pattern sostanzialmente concordanti fra i dataset A e D, e B ed E (Figura 1).

Figura 1. Ricostruzione delle dinamiche della popolazione virale nel tempo. Il valore medio è rappresentato da una linea continua (colorata in funzione del dataset in esame) mentre gli intervalli 95HPD sono rappresentati dalle aree ombreggiate.

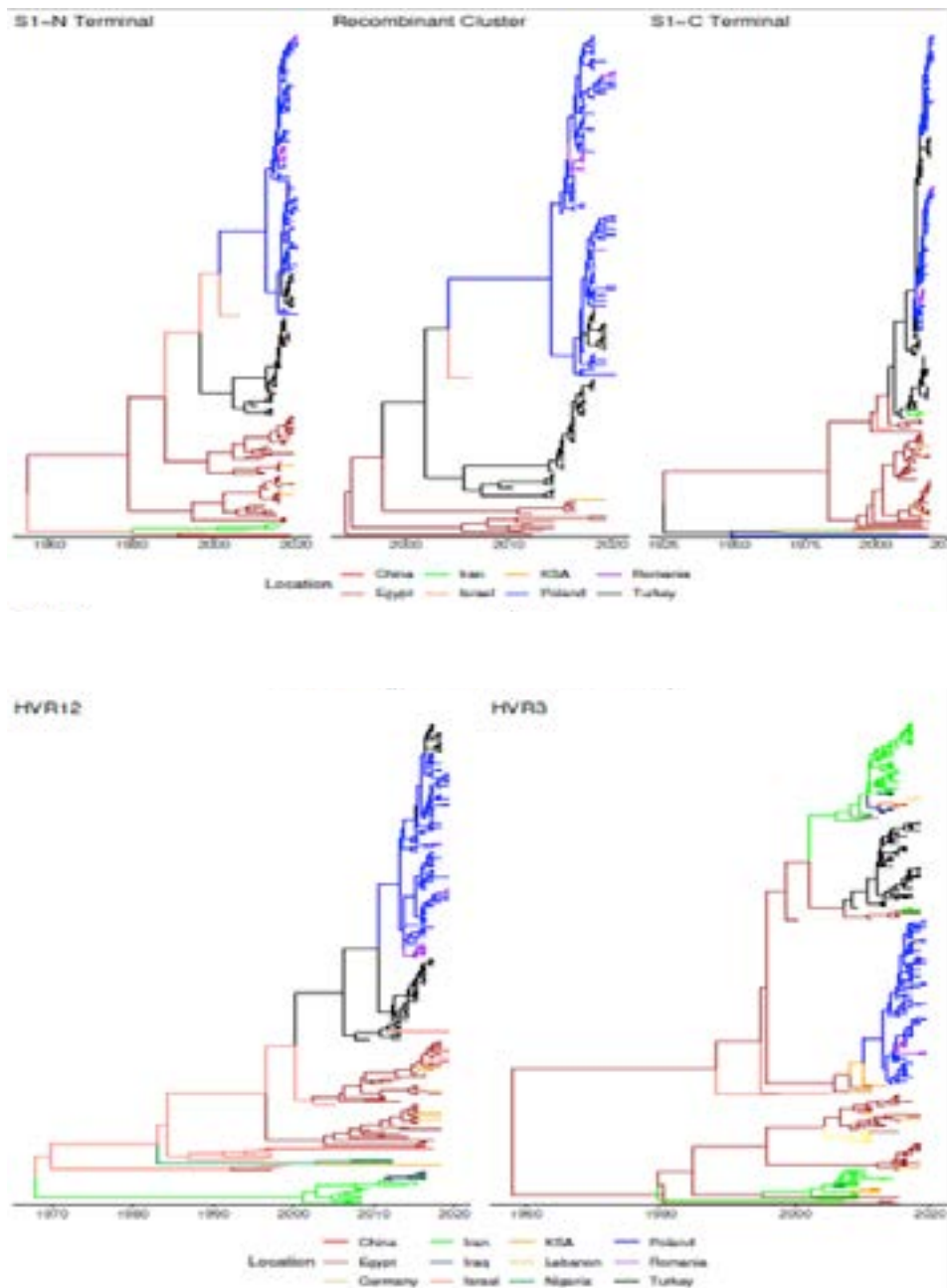


Complessivamente, una circolazione virale scarsa ma in lento e progressivo aumento è stata osservata sino indicativamente al periodo 2006-2010. Successivamente, una diminuzione nella stima delle dimensioni della popolazione virale ha caratterizzato i database basati sulla regione C-terminale dell'S1 e l'HVR3 mentre un secondo incremento, evidenziato a partire dal 2015 è stato osservato nel caso dei database N-terminale e HVR1/2. Uno scenario parzialmente sovrapponibile ha caratterizzato il cluster ricombinante che, dopo la sua origine indicativamente nella metà degli anni '90, ha dimostrato una rapida espansione, cui è seguito un marcato declino e ripresa nel periodo fra il 2010 e il 2020.

L'analisi filogeografica sembra suggerire che questo lineaggio possa aver avuto origine negli anni '50 in Medioriente, con maggior probabilità nell'area attualmente corrispondente a Israele/Palestina o, in subordine, in Egitto.

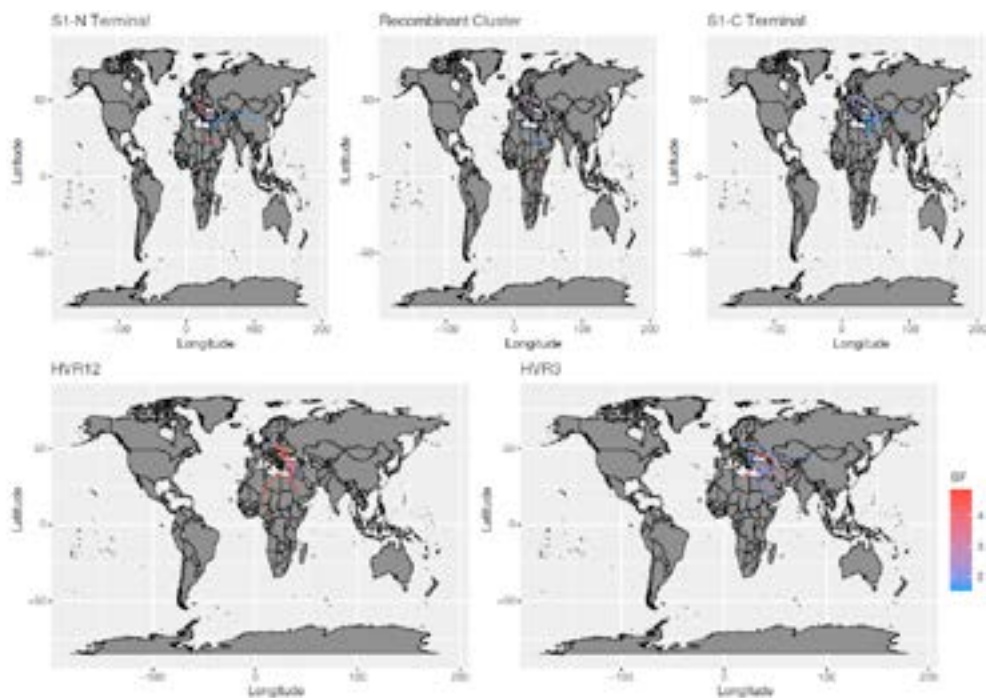
Successivamente, si sarebbe diffuso ad altri stati del Medioriente, inclusi gli Emirati Arabi Uniti e la Turchia. Quest'ultima poi avrebbe "mediato" la trasmissione dell'infezione verso l'Europa. Israele è stato anche identificato come potenziale fonte di introduzione della variante in Cina. È interessante notare come il cluster ricombinante abbia seguito una traiettoria più "europea", a differenza di altri ceppi che hanno circolato indipendentemente in Medioriente: dopo una probabile origine in Egitto, questo ceppo si sarebbe diffuso in Turchia indicativamente negli anni 2000 e quindi in Europa (~ 2010-2015), venendo introdotto con ogni probabilità in Polonia. La successiva introduzione in Romania è avvenuta probabilmente a più riprese nel corso del tempo (Figura 2).

Figura 2. MCC ricostruiti sulla base dei diversi dataset (i.e. regioni del gene S1 e cluster ricombinante). I rami degli alberi filogenetici sono stati colorati sulla base del paese in cui, con maggior probabilità, circolavano gli antenati degli stipiti campionati.



L'analisi di tutte le sequenze per le quali fosse disponibile almeno la regione HVR1/2 o HVR3 ha confermato il pattern sopra descritto, fornendo in aggiunta una maggiore risoluzione spaziale dato il maggior numero di paesi per i quali fossero fruibili delle sequenze. Un'origine mediorientale (Egitto e Israele) è stata inferita con entrambe le regioni. L'Iran, dopo l'importazione del GI-23 dall'Egitto, sembra aver svolto un ruolo rilevante nella successiva diffusione nella regione, ed in particolare in Kurdistan e Iraq, da dove Variante2 si sarebbe poi diffusa in Afghanistan e Siria. Parallelamente, l'Egitto sarebbe coinvolto nella diffusione virale in Libia e Oman, mentre i ceppi identificati in Libano e Nigeria avrebbero una probabile origine Israeliana. Valutando le connessioni internazionali caratterizzate da un elevato supporto statistico, lo scenario precedentemente descritto appare sostanzialmente confermato, con vie di diffusione consistenti specialmente all'interno dell'Europa, del Medio e Estremo Oriente, a loro volta connessi da un numero limitato di stati "ponte"; Turchia e Iran in particolare (Figura 3).

Figura 3. Rappresentazione grafica pattern di migrazione virale fra paesi aventi elevato supporto statistico ($BF > 10$) calcolato per i diversi dataset.



DISCUSSIONE

Il grande potenziale evolutivo di IBV ha portato all'emergere di diversi genotipi e lineaggi nel corso del tempo, alcuni dei quali caratterizzati da un notevole successo epidemiologico [14]. Fra questi spicca sicuramente il GI-23, inizialmente identificato in Medioriente ma attualmente circolante in Asia, Africa ed Europa. Sfortunatamente, sia in ambito diagnostico che di ricerca, la mancata standardizzazione dei protocolli di sequenziamento e la notevole variabilità dei tratti genomici interessati rende spesso difficile, se non impossibile, il confronto dei dati disponibili. Inoltre, differenze nella regione genomica considerata e nella composizione del database di sequenze possono portare alla ricostruzione di storie evolutive diverse. Per questo motivo si è scelto di creare più dataset ed analizzarli indipendentemente, massimizzando l'informazione disponibile.

Indipendentemente dal dataset preso in considerazione, il presente studio conferma alcune evidenze già dimostrate per altri lineaggi di IBV (e.g. GI-16 e GI-19), ossia l'elevato tasso evolutivo e la tendenza a circolare, anche per prolungati periodi di tempo, prima dell'identificazione formale [4,15]. Il GI-23 ha rivelato un tasso evolutivo comparabile a quello di altre varianti rivelatesi una grande minaccia per l'allevamento avicolo nel lungo periodo. È quindi possibile ipotizzare un simile potenziale anche per questo lineaggio.

L'analisi delle dinamiche di popolazione e la filogeografia del GI-23 ha permesso una maggiore comprensione della sua epidemiologia ed evoluzione, il cui successo ha probabilmente richiesto l'intervento di diversi co-fattori.

Infatti, questo gruppo virale ha circolato per un lungo periodo, senza essere identificato, in Medioriente, a bassa prevalenza e probabilmente causando danni modesti [16–22]. Tale scenario potrebbe essere ricondotto a diverse concause, non mutualmente esclusive: 1) una virulenza inizialmente modesta, a cui avrebbe fatto seguito una progressiva evoluzione con conseguente aumento in infettività, virulenza ecc.; 2) uno sviluppo limitato dell'avicoltura in queste regioni nella seconda metà del secolo scorso; 3) una scarsa attività diagnostica legata alle scarse risorse economiche e tecnologiche.

Successivamente, fra gli anni '90 e 2000, è stato evidenziato un aumento progressivo ma costante della dimensione della popolazione virale, probabile conseguenza della diffusione ad altri stati della regione e della comparsa (o aumento) di "fattori di rischio". È interessante in tal senso come molte delle sequenze ottenute in questo periodo originino da stati quali Israele e Turchia. Il sistema di allevamento più avanzato ed intensivo in questi paesi rispetto a quelli limitrofi potrebbe aver creato condizioni favorevoli per un'espansione della popolazione virale, mentre servizi veterinari e diagnostici più avanzati avrebbero permesso una più efficace identificazione del problema. In altre parole, lo sviluppo più tardivo del settore avicolo in Medioriente potrebbe aver contribuito a ritardare l'espansione di questo lineaggio rispetto ad altri, quali QX (GI-19) e Q1 (GI-16) che hanno infatti circolato più precocemente nei paesi industrializzati [4,15].

La successiva fase di diminuzione e ripresa nelle dimensioni della popolazione virale è di più difficile interpretazione. In quel periodo un vaccino omologo è stato sviluppato e applicato in alcuni stati [23–26]. Sebbene la percentuale di popolazione avicola effettivamente coinvolta dalla vaccinazione a livello mondiale sia trascurabile, va ricordato che la stragrande maggioranza delle sequenze disponibili

nel corrispondente periodo originano proprio da quegli stati più industrializzati dove la vaccinazione veniva applicata. Di conseguenza, la diminuzione nella dimensione della popolazione virale potrebbe riflettere dei pattern locali in stati dove veniva applicata la vaccinazione, piuttosto che uno scenario globale dove l'impatto della vaccinazione potrebbe dirsi trascurabile. Altre ipotesi e fattori epidemiologici potrebbero giustificare lo scenario osservato e sarebbero sicuramente degni di studi approfonditi se dovessero rendersi disponibili nuove sequenze.

Dall'analisi filogeografica emerge inoltre come la circolazione virale, in particolare a livello Europeo, appaia ridotta rispetto ad altre varianti precedentemente menzionate. Anche in Medio Oriente ed Asia, l'espansione virale sembra coinvolgere primariamente paesi confinanti o con forti relazioni di carattere economico e politico. Appare quindi legittimo ipotizzare come frequenti e stretti contatti fra paesi si siano resi necessari per l'importazione di questa variante. Solo alcune nazioni, Turchia in particolare, hanno svolto un ruolo prioritario nella diffusione del virus fra paesi appartenenti a diverse macroaree geografiche.

In tale frangente non può però essere sminuito l'impatto negativo della scarsa attività di sequenziamento che ha caratterizzato i primi anni della circolazione virale, in particolar modo nei paesi in via di sviluppo. Questa mancanza di dati limita sicuramente lo studio della migrazione virale e diversi "passaggi" fra uno stato e l'altro potrebbero non essere stati identificati, così come la direzionalità della trasmissione potrebbe essere stata mal interpretata. Infatti, nonostante gli sforzi spesi per costituire dei dataset quanto più completi possibile, la maggior parte dei ceppi di GI-23 non è sicuramente stata identificata e sequenziata. La natura retrospettiva dello studio ha poi reso di fatto impossibile l'acquisizione di nuovi dati. Tali evidenze dovrebbero fungere da monito sull'importanza di un'attività di sequenziamento quanto più intensa e standardizzata possibile, e dall'imprescindibile sforzo di condivisione dei dati disponibili a livello internazionale. Nonostante questi innegabili limiti, che impongono prudenza nell'interpretazione dei risultati, la concordanza dei risultati ottenuti analizzando diversi dataset supporta la robustezza dei dati ottenuti.

Una nota a parte, data la grande rilevanza sotto il profilo evolutivo, è rappresentata dal grande successo dimostrato del cluster ricombinante. Infatti, questa clade ha rivelato una maggiore capacità espansiva anche durante la sua circolazione nella regione Mediorientale, a supporto di un incremento della sua fitness. Il successivo declino che caratterizza anche questa clade, similmente alle altre, potrebbe essere ascrivibile all'applicazione di misure di controllo in combinazione con la crescente immunità di popolazione. Questa ipotesi spiegherebbe anche la seconda impennata nelle dimensioni di questo cluster che segue la sua introduzione in Europa, in presenza di una popolazione naïve ed in assenza di vaccini specifici per questa variante [27,28]. Sebbene studi sperimentali abbiano evidenziato l'effetto proteggente dei vaccini attualmente utilizzati in Europa nei confronti del GI-23, evidenze consistenti che questo avvenga anche in condizioni di campo non sono ad oggi presenti, e dovrebbero quindi essere attentamente valutate [25,28].

CONCLUSIONI

Complessivamente, lo studio della storia del lineaggio GI-23 può essere considerato una chiara rappresentazione della rilevanza pratica della "triade epidemiolo-

gica”. L’interazione fra l’evoluzione virale (e.g. il potenziale aumento di virulenza del cluster ricombinante), l’ospite (popolazioni animali più dense, stressate e con un patrimonio genetico più omogeneo) e ambiente (condizioni di allevamento e gestione degli stessi, presenza di co-infezioni, applicazione di strategie di controllo) appare infatti implicata nel determinismo dell’epidemiologia di questo lineage. Scenari del tutto comparabili, in parte condizionati da fattori deterministici, in parte stocastici, potrebbero spiegare il successo differenziale di altre varianti di IBV comparse a livello mondiale nel corso del tempo. Lo studio delle diverse varianti virali potrebbe quindi permettere di svelare connessioni epidemiologiche precedentemente sconosciute assieme ai sottostanti fattori determinanti. Conseguentemente, ulteriori e più approfonditi studi dovrebbero essere incoraggiati e sostenuti per incrementare la conoscenza globale di questo argomento, fornendo informazioni e competenze che potrebbero essere facilmente estese ad altre infezioni di interesse veterinario e umano. In tal senso, l’approccio ivi descritto potrebbe trovare immediata applicazione allo studio di altri lineaggi di IBV attualmente poco noti e/o circolati in aree geografiche trascurate per la loro scarsa rilevanza economica. Infine, i limiti dello studio legati alla scarsità di sequenze, al *bias* nella loro distribuzione geografica e temporale e alla mancata standardizzazione dell’approccio di sequenziamento dovrebbero fungere da monito sulla rilevanza di implementare attività di sequenziamento routinarie, rappresentative dello scenario epidemiologico e concertate fra laboratori di diverse regioni del mondo.

BIBLIOGRAFIA

1. Jackwood, M.W.; Wit, S. Infectious Bronchitis. In *Diseases of Poultry*; Wiley, 2020; Vol. 12, pp. 167–188.
2. Jackwood, M.W.; Hall, D.; Handel, A. Molecular Evolution and Emergence of Avian Gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2012, *12*, 1305–1311, doi:10.1016/j.meegid.2012.05.003.
3. Valastro, V.; Holmes, E.C.; Britton, P.; Fusaro, A.; Jackwood, M.W.; Cattoli, G.; Monne, I. S1 Gene-Based Phylogeny of Infectious Bronchitis Virus: An Attempt to Harmonize Virus Classification. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, *39*, 349–364, doi:10.1016/j.meegid.2016.02.015.
4. Franzo, G.; Massi, P.; Tucciarone, C.M.; Barbieri, I.; Tosi, G.; Fiorentini, L.; Ciccozzi, M.; Lavazza, A.; Cecchinato, M.; Moreno, A. Think Globally, Act Locally: Phylodynamic Reconstruction of Infectious Bronchitis Virus (IBV) QX Genotype (GI-19 Lineage) Reveals Different Population Dynamics and Spreading Patterns When Evaluated on Different Epidemiological Scales. *PLoS ONE* 2017, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0184401.
5. Moreno, A.; Franzo, G.; Massi, P.; Tosi, G.; Blanco, A.; Antilles, N.; Biarnes, M.; Majó, N.; Nofrarias, M.; Dolz, R.; et al. A Novel Variant of the Infectious Bronchitis Virus Resulting from Recombination Events in Italy and Spain. *Avian Pathology* 2017, *46*, 28–35, doi:10.1080/03079457.2016.1200011.
6. Houta, M.H.; Hassan, K.E.; El-Sawah, A.A.; Elkady, M.F.; Kilany, W.H.; Ali, A.; Abdel-Moneim, A.S. The Emergence, Evolution and Spread of Infectious Bronchitis Virus Genotype GI-23. *Archives of Virology* 2021, *166*, 9–26.
7. Cavanagh, D.; Mawditt, K.; Britton, P.; Naylor, C.J. Longitudinal Field Studies of Infectious Bronchitis Virus and Avian Pneumovirus in Broilers Using

- Type-Specific Polymerase Chain Reactions. *Avian Pathology* 1999, 28, 593–605, doi:10.1080/03079459994399.
8. Standley, K. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability.(Outlines Version 7). *Molecular Biology and Evolution* 2013, 30, 772–780, doi:10.1093/molbev/mst010 [doi].
 9. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 2015, 32, 268–274, doi:10.1093/molbev/msu300.
 10. Martin, D.P.; Murrell, B.; Golden, M.; Khoosal, A.; Muhire, B. RDP4: Detection and Analysis of Recombination Patterns in Virus Genomes. *Virus Evolution* 2015, 1, 1–5, doi:10.1093/ve/vev003.
 11. Kosakovsky Pond, S.L.; Posada, D.; Gravenor, M.B.; Woelk, C.H.; Frost, S.D.W. GARD: A Genetic Algorithm for Recombination Detection. *Bioinformatics* 2006, 22, 3096–3098, doi:10.1093/bioinformatics/btl474.
 12. Suchard, M.A.; Lemey, P.; Baele, G.; Ayres, D.L.; Drummond, A.J.; Rambaut, A. Bayesian Phylogenetic and Phylodynamic Data Integration Using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 2018, 4, doi:10.1093/ve/vey016.
 13. Lemey, P.; Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Suchard, M.A. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLoS Computational Biology* 2009, 5, e1000520, doi:10.1371/journal.pcbi.1000520.
 14. Cook, J.K.A.; Jackwood, M.; Jones, R.C. The Long View: 40 Years of Infectious Bronchitis Research. *Avian Pathology* 2012, 41, 239–250, doi:10.1080/03079457.2012.680432.
 15. Franzo G.; Cecchinato M.; Tosi G.; Fiorentini L.; Faccin F.; Tucciarone C.M.; Trogu T.; Barbieri I.; Massi P.; Moreno A. GI-16 Lineage (624/I or Q1), There and Back Again: The History of One of the Major Threats for Poultry Farming of Our Era. *PLOS ONE* 2018, 13, e0203513, doi:10.1371/journal.pone.0203513.
 16. Abdel-Moneim, A.S.; Madbouly, H.M.; Gelb, J.; Ladman, B.S. Isolation and Identification of Egypt/Beni-Seuf/01 a Novel Genotype of Infectious Bronchitis Virus. *VETERINARY MEDICAL JOURNAL-GIZA-* 2002, 50, 1065–1078.
 17. Al-Mubarak, A.I.A.; Al-Kubati, A.A.G. Cocirculation of Four Infectious Bronchitis Virus Lineages in Broiler Chickens in the Eastern Region of Saudi Arabia from 2012 to 2014. *Veterinary Medicine International* 2020, 2020, doi:10.1155/2020/6037893.
 18. Gelb, J.; Weisman, Y.; Ladman, B.S.; Meir, R. S1 Gene Characteristics and Efficacy of Vaccination against Infectious Bronchitis Virus Field Isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathology* 2005, 34, 194–203, doi:10.1080/03079450500096539.
 19. Hosseini, H.; Fard, M.H.B.; Charkhkar, S.; Morshed, R. Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010–2014). *Avian Diseases* 2015, 59, 431–435, doi:10.1637/11091-041515-ResNote.1.
 20. Meir, R.; Rosenblut, E.; Perl, S.; Kass, N.; Ayali, G.; Hemsani, E.; Perk, S. Identification of a Novel Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus in Israel. *Avian Diseases* 2004, 48, 635–641, doi:10.1637/7107.
 21. Moharam, I.; Sultan, H.; Hassan, K.; Ibrahim, M.; Shany, S.; Shehata, A.A.;

- Abo-ElKhair, M.; Pfaff, F.; Höper, D.; el Kady, M.; et al. Emerging Infectious Bronchitis Virus (IBV) in Egypt: Evidence for an Evolutionary Advantage of a New S1 Variant with a Unique Gene 3ab Constellation. *Infection, Genetics and Evolution* 2020, 85, doi:10.1016/j.meegid.2020.104433.
22. Zany, A.; Naguib, M.M.; El-Husseiny, M.H.; Mady, W.; Hagag, N.; Arafa, A.S. The Sequence of the Full Spike S1 Glycoprotein of Infectious Bronchitis Virus Circulating in Egypt Reveals Evidence of Intra-Genotypic Recombination. *Archives of Virology* 2016, 161, 3583–3587, doi:10.1007/s00705-016-3042-1.
 23. Abozeid, H.H.; Paldurai, A.; Varghese, B.P.; Khattar, S.K.; Afifi, M.A.; Zouel-fakkar, S.; El-Deeb, A.H.; El-Kady, M.F.; Samal, S.K. Development of a Recombinant Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccine for Infectious Bronchitis Virus Variant Strains Circulating in Egypt. *Veterinary Research* 2019, 50, doi:10.1186/s13567-019-0631-5.
 24. Al-Ebshahy, E.; Abdel-Sabour, M.; Abas, O.; Yanai, T. Protection Conferred by a Vaccine Derived from an Inactivated Egyptian Variant of Infectious Bronchitis Virus: A Challenge Experiment. *Tropical Animal Health and Production* 2019, 51, 1997–2001, doi:10.1007/s11250-019-01898-y.
 25. Ali, A.; Kilany, W.H.; Zain El-Abideen, M.A.; el Sayed, M.; Elkady, M. Safety and Efficacy of Attenuated Classic and Variant 2 Infectious Bronchitis Virus Candidate Vaccines. *Poultry Science* 2018, 97, 4238–4244, doi:10.3382/ps/pey312.
 26. Sultan, H.A.; Ali, A.; el Feil, W.K.; Bazid, A.H.I.; Zain El-Abideen, M.A.; Kilany, W.H. Protective Efficacy of Different Live Attenuated Infectious Bronchitis Virus Vaccination Regimes Against Challenge With IBV Variant-2 Circulating in the Middle East. *Frontiers in Veterinary Science* 2019, 6, 341, doi:10.3389/fvets.2019.00341.
 27. Lisowska, A.; Sajewicz-Krukowska, J.; Fusaro, A.; Pikula, A.; Domanska-Blicharz, K. First Characterization of a Middle-East GI-23 Lineage (Var2-like) of Infectious Bronchitis Virus in Europe. *Virus Research* 2017, 242, 43–48, doi:10.1016/j.virusres.2017.09.010.
 28. Lisowska, A.; Piłula, A.; Opolska, J.; Jasik, A.; Kycko, A.; Domańska-Blicharz, K. Virulence Properties of GI-23 Infectious Bronchitis Virus Isolated in Poland and Efficacy of Different Vaccination Strategies. *Pathogens* 2021, 10, 522, doi:10.3390/pathogens10050522.



EFFICACIA E SICUREZZA DI UN VACCINO VIVO PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: L'ISTOPATOLOGIA SERVE ANCORA?

Giudice C.¹, Lupini C.², Benedetti V.³, Quaglia G.², Mescolini G.², Tecilla M.¹, Prandini F.³, Ortali G.⁴, Catelli E.², Volorio A.³

¹ *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, via dell'Università 6, Lodi;*

² *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia (BO);*

³ *Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Via Lorenzini 8, Milano;*

⁴ *Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi 5, San Michele Extra (VR).*

Summary

Haemorrhagic enteritis (HE) is an economically significant acute gastro-intestinal disorder caused by a group II Adenovirus. A large study was performed under field conditions, to confirm the efficacy of a live attenuated vaccine (Dindoral[®]) against Haemorrhagic Enteritis Virus (HEV) in turkeys, including virus characterisation (field or vaccine) by detecting and sequencing viral strains, clinical and macroscopic scores of spleen and duodenum, histological lesions of spleen. In the present report only the histopathological results of spleen examination will be reported, in order to discuss the role that histopathology can nowadays play in the study of avian diseases. The study was conducted starting in 2 farms located in North-West Italy, in areas with a high prevalence of HEV, where HEV live attenuated vaccines have never been used before. In each farm, two sheds were chosen and assigned to the control and treated group. The turkeys were monitored from the placement of the animals up to the end of the breeding cycle. A standard vaccination protocol was used at each site, with Dindoral[®] in drinking water at 28 days of life.

At regular intervals during the study, 5 turkeys per group were necropsied and samples of spleen were collected for histological evaluation and PCR test. Histopathological examination of haematoxylin and eosin microtomic slides obtained from formalin-fixed-paraffin-embedded spleen specimens included a histological description of spleen lesion and the count of spleen follicles present in 5/10x microscopic fields. Histopathological scores were performed in blind and compared with PCR results only at the end of the study.

The HE virus was not found until vaccination with Dindoral[®] at 28 days of age. Starting from 7 days after the vaccination, the vaccine virus was found in vaccinated groups. The field strain was detected in the unvaccinated groups starting at 35 days of age and sporadically in the vaccinated group from 49 days. The vaccine strain was never detected in unvaccinated animals.

Histological changes (presence of intranuclear inclusion bodies) confirmed the infection by HEV in all groups.

The count of spleen follicles in all groups demonstrated a general decrease in the number of follicles associated to viral infection (vaccine and field strains). The number of follicles remained low in the weeks immediately after viral infection, along with evidence of disease progression (plasmacells and histiocytes infiltration in the

spleen parenchyma). Thereafter, the number of follicles increased up to values consistent with those observed before infection. Interestingly, when compared to vaccinated groups, control groups showed more marked oscillations in the mean number of follicles during the observation period and the follicles' count remained low longer than in vaccinated animals. These results suggested that follicles/lymphocyte B in the spleen, and therefore immunocompetence, was better preserved in the vaccinated group. Histopathological examination when associated to PCR investigation, proved a valuable tool to understand the mechanisms of viral infection and vaccine efficacy.

INTRODUZIONE

L'enterite emorragica (HEV) del tacchino è una patologia sostenuta da Adenovirus (Siadenovirus), e rappresenta una rilevante causa di ritardo di crescita nei giovani soggetti. Il virus della HE (HEV) causa sintomi acuti gastrointestinali ma è anche responsabile di gravi condizioni di immunosoppressione che possono aprire la strada ad infezioni secondarie batteriche (Giovanardi *et al.* 2014) e deprimere la risposta ai vaccini (Nagaraja *et al.*, 1985), con conseguenze imponenti sull'allevamento anche dopo che la patologia virale si è risolta. La condizione di immunocompromissione è indotta primariamente dall'attività linfocitopatica del virus nei confronti dei linfociti B, che ne sono il principale target, ma è stata dimostrata anche l'infezione dei macrofagi. L'immunosoppressione indotta da HEV sarebbe quindi riconducibile all'effetto del virus HEV sui linfociti B e sui macrofagi, con conseguente riduzione della produzione di anticorpi ma anche della fagocitosi macrofagica. Il virus HEV penetra nell'organismo animale per via orofaringea e, attraverso la mucosa intestinale, raggiunge la milza, dove è già riscontrabile al secondo giorno dall'infezione e arriva al picco di replicazione al sesto giorno dall'infezione. Durante questo lasso di tempo si osservano un notevole afflusso di macrofagi nel tessuto splenico (che rendono ragione della splenomegalia osservata macroscopicamente) ed al contempo apoptosi e necrosi dei linfociti B e dei macrofagi stessi. Questa serie di eventi induce lo stato di (transitoria) immunosoppressione.

La vaccinazione dei giovani tacchini ha quindi lo scopo di ridurre le conseguenze dirette ed indirette (immunosoppressione) dell'infezione da HEV. Dal 2018 è stato reso disponibile, con un permesso temporaneo di importazione, un vaccino vivo attenuato (Dindoral® - *Domermuth strain*).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti protettivi del vaccino, in termini di sviluppo della patologia ma anche di conservazione dell'immunocompetenza, attraverso la valutazione istopatologica del parenchima splenico di tacchini esposti alla vaccinazione ed all'infezione di campo. Il lavoro è parte di uno studio molto più ampio che ha considerato anche gli aspetti clinici e biomolecolari dell'infezione da HEV.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto come trial multicentrico in due allevamenti di tacchini, con sede in aree geografiche ad alta prevalenza di HEV ed in cui la vaccinazione con virus HEV vivo attenuato non era mai stata prima utilizzata. In ogni allevamento è stato individuato un gruppo controllo ed un identico gruppo sottoposto a vaccinazione, stabulati in capannoni non adiacenti. I tacchini sono stati monitorati dall'accasamento fino al termine del ciclo produttivo, il vaccino anti-HEV è stato

somministrato con l'acqua di abbeverata al ventottesimo giorno di vita. La presenza ed il sequenziamento del virus (di campo o vaccinale) sono stati eseguiti con metodica PCR su tamponi cloacali e campioni di milza ad intervalli di 7 giorni per tutto il ciclo (Lupini et al., 2018).

Istopatologia

Per l'esame microscopico del parenchima splenico, ogni settimana (dal giorno 21 al giorno 63 dello studio), in ogni gruppo (vaccinato e controllo) di ciascun allevamento, 5 soggetti sono stati sacrificati ed è stata prelevata metà della milza che è stata immediatamente fissata in formalina tamponata (l'altra metà del parenchima splenico è stata destinata all'indagine PCR).

Da ogni campione fissato in formalina è stata ottenuta una sezione trasversale completa della milza, che è stata quindi routinariamente processata per l'esame istologico ed inclusa in paraffina. Da ogni blocchetto in paraffina sono state ottenute sezioni microtomiche di 5 micron, successivamente colorate con ematossilina eosina e quindi esaminate al microscopio ottico. Per ogni campione sono state descritte le alterazioni morfologiche del parenchima splenico. Inoltre per ogni sezione è stato valutato quantitativamente il numero totale di follicoli (centri germinativi) presenti in 5 campi microscopici a 10X. Per limitare le possibili variazioni inter-individuali, i campi sono sempre stati selezionati nell'area subcapsulare della sezione. Per ogni campionamento è stato quindi valutato il numero medio di follicoli splenici contati nei 5 soggetti sottoposti ad esame. Le valutazioni sono avvenute inizialmente in cieco rispetto ai risultati dell'esame PCR ed alla condizione vaccinale dei soggetti esaminati e solo successivamente confrontate con questi dati.

RISULTATI

Il virus HE non è stato identificato con PCR in nessun soggetto prima della vaccinazione (giorno 28): dal 7° giorno dopo la vaccinazione, il virus vaccinale è stato riscontrato nei gruppi vaccinati mentre non è mai stato reperito nei gruppi controllo. In questi ultimi il virus di campo è stato riscontrato per la prima volta al 35° giorno di età, mentre è comparso sporadicamente nel gruppo vaccinato a partire dal 49 giorno. Istologicamente, a partire dal giorno 35, nei gruppi vaccinati (vaccinazione eseguita il giorno 28) di entrambi gli allevamenti erano evidenti reperti di iperplasia della polpa bianca, dovuta soprattutto ad un massiccio afflusso di cellule istiocitarie, ed occasionalmente associata alla presenza di voluminosi corpi inclusi intranucleari basofili nelle cellule istioidee e linfoidi (compatibili con corpi inclusi da Adenovirus). A partire dal giorno 42 a questa popolazione cellulare si associava un numero considerevole di plasmacellule.

Nei gruppi non vaccinati i primi segni di iperplasia della polpa bianca, con le medesime caratteristiche sopra descritte e la più diffusa evidenza di corpi inclusi intranucleari basofili, era parimenti riscontrabile a partire dal giorno 35 e si associava, talora già nelle prime fasi, a marcata riduzione del volume dei follicoli linfoidi. L'infiltrazione di plasmacellule, nel complesso più contenuta, era evidente un poco più tardivamente, a partire dal giorno 49.

La conta dei follicoli splenici dava risultati variabili tra i soggetti, in accordo con il differente stadio della patologia, era comunque possibile definire un trend generale di variazione del numero totale dei follicoli che subiva una flessione, rispetto ai va-

lori medi osservati nelle prime settimane dello studio, in corrispondenza delle prime fasi dell'infezione. Il numero dei follicoli rimaneva quindi basso nelle settimane immediatamente successive per poi risalire a livelli paragonabili a quelli pre-infezione al termine del periodo di osservazione. Questo trend generale, osservabile in tutti i soggetti esaminati, era caratterizzato tuttavia da una sostanziale differenza tra i gruppi: il gruppo controllo infatti mostrava, rispetto a quello vaccinato, oscillazioni più marcate nel numero medio di follicoli con una più consistente riduzione dopo l'ingresso del virus di campo e un persistere più a lungo di valori di conta bassi.

DISCUSSIONE

L'enterite emorragica (HEV) è una rilevante causa di immunosoppressione nel tacchino, con ricadute sia sul tasso di crescita che sull'esposizione ad altre patologie e sulla capacità di risposta alle vaccinazioni. La vaccinazione anti-HEV si pone quindi l'obiettivo di contrastare gli effetti diretti (mortalità da enterite emorragica) e indiretti (immunodepressione) causati dall'infezione. Parametrare e quantificare l'immunocompetenza dei soggetti, soprattutto in uno studio di campo, non è compito facile. Nel presente lavoro l'indagine istologica del tessuto splenico, organo target della replicazione virale e chiave per il mantenimento dell'immunocompetenza, ha fornito dati rilevanti e contribuito a chiarire l'effetto del virus vaccinale sull'organismo. La conta dei follicoli splenici, quando applicata al gruppo in esame, ha fornito una buona stima della capacità reattiva dell'organismo, consentendo di evidenziare una differente evoluzione delle lesioni nei soggetti vaccinati rispetto a quelli non vaccinati. Essenziale è stato poter contare sui dati di valutazione PCR, che hanno consentito di distinguere con certezza la presenza del virus vaccinale rispetto a quello di campo. L'esame istologico ed in particolare la conta dei follicoli splenici non devono naturalmente essere intesi come una valutazione assoluta sul singolo individuo, ma quando interpretati nel contesto del gruppo ed integrati con dati clinici e molecolari hanno contribuito significativamente a meglio comprendere le dinamiche dell'infezione e della risposta vaccinale.

CONCLUSIONI

In conclusione, la risposta al quesito che ci siamo posti all'inizio dello studio, se l'istologia sia ancora utile nello studio della patologia aviaria, è affermativa: l'esame istopatologico non sostituisce gli altri esami di laboratorio, non è un test rapido, non sempre fornisce risposte sul singolo soggetto ma integra in maniera estremamente importante le informazioni degli altri test diagnostici e contribuisce alla comprensione dei meccanismi eziopatogenetici alla base delle patologie.

BIBLIOGRAFIA

1. Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G, Catelli E. 2014. Longitudinal field studies of Avian Metapneumovirus and Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. *Vet Res Commun.* 38:129–137.
2. Lupini C, Mescolini G, Alastra G, Silveria F, Felice V and E Catelli (2018) Enterite emorragica del tacchino: caratterizzazione molecolare di ceppi circolanti in

- Italia. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2018. III Simposio Scientifico, Parma 14 Settembre 2018. pp. 131-134
3. Nagaraja KV, Kang SY, Newman JA. 1985. Immunosuppressive effects of virulent strain of hemorrhagic enteritis virus in turkeys vaccinated against Newcastle disease. *Poult Sci.* 64:588–590.
 4. Kuldeep Dhama, Vasudevan Gowthaman, Kumaragurubaran Karthik, Ruchi Tiwari, Swati Sachan, M. Asok Kumar, M. Palanivelu, Yashpal Singh Malik, Raj Kumar Singh, Muhammad Munir 2017. Haemorrhagic enteritis of turkeys – current knowledge, *Veterinary Quarterly*, 37:1, 31-42



IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA SPECIE DI CIRCOVIRUS IN UN ALLOCCO (*STRIX ALUCO*) IN SUD ITALIA

Grassi L.¹, Legnardi M.¹, Franzo G.¹, Menandro M.L.¹, Tucciarone C.M.¹, Minichino A.², Dipineto L.², Fioretti A.², Cecchinato M.¹

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

² Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137 Napoli, Italia

Summary

The genus *Circovirus* recognizes 49 species found in a broad range of vertebrates, most of which have been described in the last decade thanks to the advancement of molecular diagnostics. In particular, more than ten avian circoviruses are currently known, most notably *beak and feather disease virus*, which is responsible for a relevant disease in Psittacine birds. However, little is known about the circulation and impact of these viruses in wildlife species. To fill this gap, the present study aimed to assess the possible presence of circoviruses in birds of prey. A total of 61 liver and 13 spleen samples were collected during anatomico-pathological examinations of birds of prey belonging to ten different species, which were recovered at the wildlife rescue centre Federico II in Naples (Southern Italy). Only one spleen sample, collected from a tawny owl (*Strix aluco*) tested positive to a PCR based on genus-specific primers. The complete genome sequence was obtained by primer walking and revealed a 1745 nt-long circular genome, featured by the typical organization of circoviruses, with two major ORFs encoding for a capsid (*Cap*) and a replication-associated (*Rep*) protein. According to ICTV demarcation criteria, this virus qualifies as a new species, which was tentatively named "*tawny owl-associated circovirus*". Phylogenetic analyses showed that this newly discovered virus is closer to mammalian circoviruses than to avian ones. Specifically, it is more related to a rodent circovirus, possibly suggesting that its actual host may have been a rodent, either preyed in the wild or fed to the tawny owl during its stay at the rescue centre. Therefore, further efforts should be devoted to investigate the presence of *tawny owl-associated circovirus* in both populations, to shed light on its host range and better characterize its epidemiology.

INTRODUZIONE

Il genere *Circovirus*, appartenente alla famiglia *Circoviridae*, include più di 40 specie di virus icosaedrici, sprovvisti di *envelope* e caratterizzati da un genoma a singolo filamento circolare di DNA dalla lunghezza compresa tra 1700 e 2300 basi. Viste le dimensioni particolarmente ridotte, vengono considerati come i virus a DNA più piccoli in grado di infettare mammiferi ed uccelli (1). I circovirus di interesse aviario sono stati isolati da diverse specie e, nonostante le molte similarità, sono solitamente caratterizzati da una spiccata specie-specificità. La via di trasmissione principale è quella orizzontale, strettamente correlata alla notevole resistenza delle particelle virali in ambiente, ma in alcuni casi è stata descritta anche la trasmissione verticale. L'ingresso del virus avviene tipicamente tramite ingestione, a cui fa seguito un'infezione del tratto intestinale con conseguente viremia e diffusione ad altri tessuti e organi. L'escrezione virale avviene soprattutto per via fecale. Lo spiccato epiteliotropismo e linfotropismo fa sì che la sintomatologia si possa manifestare

con alterazioni del tegumento e/o stati immunodepressivi (2). La specie di circovirus più studiata in ambito aviario è sicuramente *beak and feather disease virus* (BFDV), responsabile di una malattia nota già alla fine dell'800 e strettamente associata all'ordine degli Psittaciformi. In una fase iniziale, la malattia si manifesta clinicamente con perdita e alterazione/deformazione delle penne a cui fanno seguito anche possibili deformità del becco, da cui deriva il nome di questo agente eziologico. Una manifestazione clinica meno appariscente, ma ugualmente associata alla presenza di questo virus, si evidenzia in giovani animali con crescita rallentata, deperimento e infezioni batteriche secondarie, conseguenti all'azione immunosoppressiva indotta dal virus (3). Altre specie di circovirus sono causa di malattia in specie aviari non appartenenti all'ordine degli Psittaciformi. Anche in questo caso la principale attività patogena si manifesta a livello immunitario. L'immunosoppressione predispone gli animali alla perdita di peso e al deperimento, a cui tipicamente si associa l'insorgere di infezioni secondarie responsabili delle manifestazioni cliniche più evidenti (2, 3). Ad oggi, diverse specie di circovirus sono state descritte in piccioni (*Pigeon Circovirus*), canarini (*Canary Circovirus*), gabbiani (*Gull Circovirus*), oche (*Goose Circovirus*), anatre (*Duck Circovirus*), fringuelli (*Finch Circovirus*), pinguini (*Penguin Circovirus*), corvidi (*Raven Circovirus*), stornelli (*Starling Circovirus*), cigni (*Swan Circovirus*) e diamanti mandarini (*Zebra Finch Circovirus*) (1). I circovirus meglio caratterizzati sono quelli che affliggono specie allevate, come animali da cortile o specie ornamentali/canore, in quanto più frequentemente sottoposte ad esame anatomo-patologico e/o indagini molecolari. Di conseguenza, i dati riguardo la presenza e prevalenza di circovirus nell'avifauna selvatica sono particolarmente scarsi, quantomeno in Europa, dove sono limitati alla segnalazione di alcuni focolai in gabbiani, storni e cigni a seguito del ritrovamento di esemplari deceduti. In particolare, per quanto riguarda i rapaci, le informazioni riguardanti la loro diffusione sono quasi del tutto assenti (2). Nel presente studio, la presenza di circovirus è stata indagata in rapaci sia diurni che notturni provenienti dal Sud Italia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Le attività di campionamento sono state condotte presso il Centro Recupero Animali Selvatici (CRAS) "Federico II" del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli. Durante l'esame anatomo-patologico sono stati prelevati campioni di fegato e milza, organi nei quali era già stata riportata la presenza di circovirus in altre specie aviari (4). I campioni sono stati conservati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

Analisi molecolari

Dopo l'eluizione dei campioni in tampone fosfato salino (PBS), il DNA virale è stato estratto con il kit DNEasy Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Germania). Le analisi di PCR sono state condotte con il kit Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). È stata impiegata la coppia di *primer* degenerati CV1F (5'-GGIAYICCCAYYTICARGG-3') e CV1R (5'-AWCCAICCRTARAARTCRTC-3'), disegnata da Li et al. (2010) basandosi sulla sequenza di esponenti di ciascuna delle specie virali del genere *Circovirus* allora conosciute (5). I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger dell'intero genoma, ottenuto mediante *primer walking*. I segmenti genomici così ottenuti sono stati sottoposti ad un'analisi qualitativa e a *trimming* usando il programma FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e assemblati con il software ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD, Australia). Infine, il genoma è stato analizzato per la ricerca di *open*

reading frame (ORF) usando ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

Analisi filogenetica

I genomi completi così ottenuti sono stati sottoposti ad un'indagine BLAST (6) per accertarne l'appartenenza al genere *Circovirus*. Le sequenze sono state poi allineate ad un database composto da ceppi di referenza di ciascuna delle 49 specie di circovirus ad oggi conosciute (1), utilizzando l'algoritmo MUSCLE implementato nel software MEGA X (7). Le successive analisi filogenetiche hanno permesso di studiare le relazioni dei ceppi identificati con le specie conosciute e di determinare se si qualificassero come nuove specie.

RISULTATI

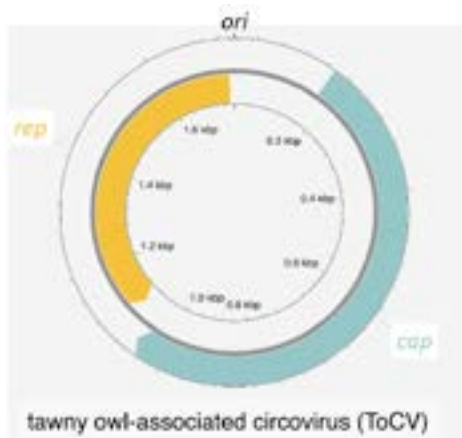
Campionamento

In totale sono stati analizzati 61 campioni di fegato da rapaci sia diurni che notturni. In particolare, sono state indagate 10 specie diverse: allocco (*Strix aluco*), assiolo (*Otus scopus*), astore (*Accipiter gentilis*), barbagianni (*Tyto alba*), civetta comune (*Athene noctua*), falco pellegrino (*Falco peregrinus*), gheppio (*Falco tinnunculus*), gufo comune (*Asio otus*), lodolaio (*Falco subbuteo*) e poiana (*Buteo buteo*). Per 13 di questi animali sono stati analizzati anche campioni di milza.

Analisi molecolari

Tutti i campioni sono risultati negativi alle analisi PCR ad eccezione di un campione di milza prelevato da un allocco ricoverato per una grave lesione all'avambraccio destro, deceduto poco dopo il ricovero, per cause traumatiche. Oltre alla lesione muscolo-scheletrica all'arto destro, l'animale si presentava in scarso stato di nutrizione (BCS 1) e riportava inoltre un ematoma cerebellare, lesioni ulcerative a livello di stomaco ghiandolare, fegato e milza ipotrofici. L'esame ematologico ha evidenziato linfocitosi ed eterofili reattivi. Sulla base della sequenza parziale ottenuta dalla PCR genere-specifica, una seconda coppia di primer, RC2-F (5'-CCAAGACGCTACTACGCACA-3') e RC2-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3'), è stata disegnata per permettere il sequenziamento dell'intero genoma, che è risultato avere una lunghezza di 1745 nucleotidi. Sono stati identificati due ORF maggiori: uno situato sul filamento virale, lungo 954 nucleotidi e codificante per la replicasi (*Rep*), l'altro sito sul filamento complementare, della lunghezza di 645 nucleotidi e codificante per la proteina capsidica (*Cap*) (Figura 1).

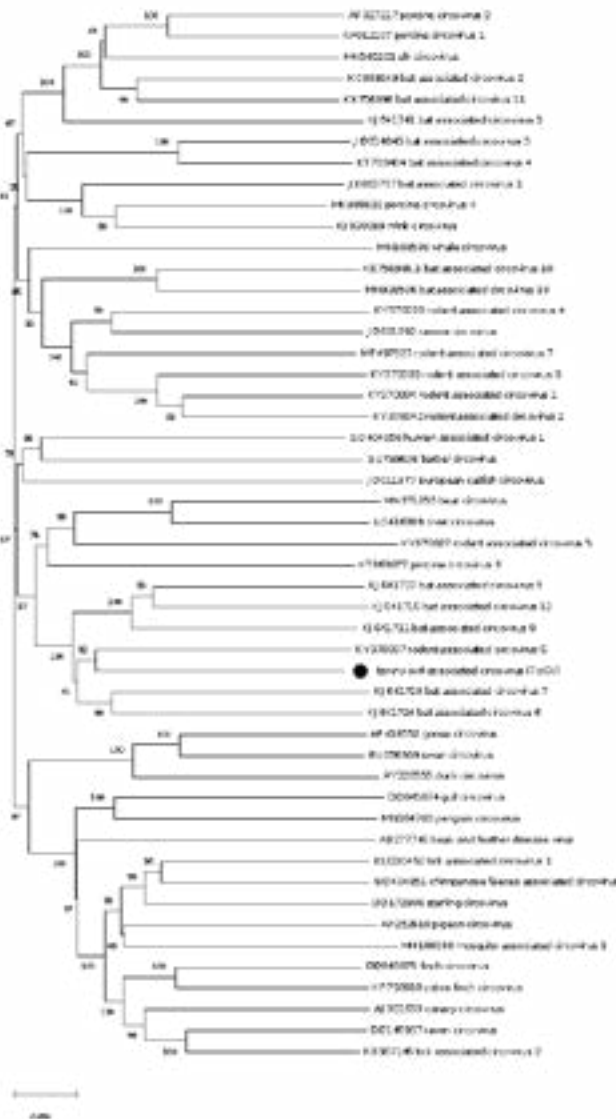
Figura 1. Rappresentazione del genoma di *tawny owl-associated circovirus*.



Analisi filogenetica

L'analisi filogenetica ha rivelato come il circovirus ritrovato nell'alocco appartenga ad un cluster che comprende circovirus identificati in pipistrelli e roditori (Figura 2). In particolare, la specie virale con cui condivide il più alto valore di identità genomica (i.e. 60.6%) è il *rodent associated circovirus 6*.

Figura 2. *Tawny owl-associated circovirus* e le relazioni filogenetiche tra le specie virali attualmente appartenenti al genere *Circovirus*. Il ToCV è evidenziato dal pallino nero. L'albero filogenetico è stato inferito con metodica Neighbor-joining e 1000 replicati.



DISCUSSIONE

Il genoma del virus identificato nell'alocco presenta tutte le caratteristiche tipiche dei circovirus (Figura 1). Si tratta di un genoma circolare di piccole dimensioni e ambisenso, con un gene *rep* più conservato sul filamento virale e un gene *cap* più divergente sul filamento complementare. Tra *rep* e *cap* si possono individuare due regioni intergeniche. All'interno di quella di maggiori dimensioni, situata tra le due estremità 5', è presente l'origine di replicazione (*ori*), che consiste in un nonanucleotide altamente conservato caratterizzato dal motivo 'AA-GTATTAC'. Durante la replicazione, che avviene tramite *rolling circle replication*, la proteina *Rep* taglia il filamento virale tra la settima e l'ottava posizione di questa sequenza (8). Secondo i criteri di demarcazione tra specie attualmente in vigore per il genere *Circovirus*, secondo cui il valore di *pairwise identity* deve essere inferiore a 80% (4), il virus sequenziato si qualifica come una nuova specie, provvisoriamente denominata *tawny owl-associated circovirus* (ToCV). Secondo le linee guida proposte da Rosario et al. (2017), infatti, la parola "*associated*" va inserita qualora l'individuazione dell'ospite definitivo non sia adeguatamente supportata dal punto di vista biologico, come nel caso di ToCV (4). Dal punto di vista evolutivo infatti, questo virus sembra avere maggiori affinità con specie ritrovate in mammiferi, in particolare roditori, piuttosto che in uccelli. Una possibile interpretazione di questo risultato è che l'ospite di ToCV possa essere stato un micro-mammifero. Questa ipotesi è supportata dal fatto che, durante il periodo di ricovero presso il CRAS, l'alocco è stato nutrito con roditori allevati. È inoltre probabile che, anche allo stato selvatico, l'animale possa aver cacciato roditori. Ricordando l'elevata specie-specificità tipica dei circovirus, si riporta come in letteratura siano già state isolate specie di circovirus da ospiti non convenzionali. Queste positività però, si descrivono soprattutto da campioni di feci, coerentemente con una trasmissione alimentare dovuta a predazione, in probabile assenza di replicazione virale (5). In questo caso però, il virus è stato trovato nella milza e il meccanismo di questo fenomeno non è ancora stato chiarito. Una seconda ipotesi trova spiegazione in un possibile *spillover* tra la specie di roditore e l'alocco, dovuta alla frequente esposizione preda-predatore. Sebbene le lesioni anatomo-patologiche rilevate, soprattutto quelle riguardanti fegato e milza, siano probabilmente riconducibili allo stato di grave malnutrizione dell'animale, non si esclude un possibile contributo dato dalla replicazione virale. Saranno necessari ulteriori studi per identificare l'ospite naturale dell'infezione, permettendo così di chiarirne l'epidemiologia e la possibile patogenicità, indagando ulteriormente sia i rapaci che i micro-mammiferi.

CONCLUSIONE

Questo studio preliminare ha permesso di indagare la presenza di circovirus in numerose specie di rapaci selvatici, ad oggi scarsamente studiate. Sui 61 rapaci analizzati, solo un esemplare di alocco è risultato positivo all'infezione. Il ritrovamento è stato di particolare rilievo in quanto ha portato all'identificazione di una nuova specie virale, attualmente denominata *tawny owl-associated circovirus*, più vicina ai circovirus dei micromammiferi che degli uccelli. Per questo motivo, saranno necessarie ulteriori indagini per chiarire l'epidemiologia di questa nuova specie.

BIBLIOGRAFIA

1. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/circoviridae/659/genus-circovirus
2. Gavier-Widén D, Duff PJ, Meredith A. (2012). Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe, Chapter “Circovirus Infections” pages 67-72
3. Thomas NJ, Hunter BD, Atkinson CT. (2007). Infectious Diseases of Wild Birds, Chapter “Circovirus”, pages 194-205
4. Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. (2017). Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol.* 162(5): 1447-1463.
5. Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjango JB, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E. (2010). Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. *J. Virol.* 84(4): 1674-1682.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
7. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.
8. Steinfeldt T, Finsterbusch T, Mankertz A. (2006). Demonstration of nicking/joining activity at the origin of DNA replication associated with the rep and rep' proteins of porcine circovirus type 1. *J. Virol.* 80(13): 6225-6234.

VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA AVIARE ED UCCELLI SELVATICI: REVISIONE SISTEMATICA E METANALISI DEI DATI SU SCALA GLOBALE

Graziosi G.¹, Catelli E.¹, Fanelli A.², Lupini C.¹

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

² Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Bari, Strada Provinciale 62, 70010 Valenzano (BA), Italia

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is an economically important pathogen for poultry, whereas knowledge of its occurrence in non-poultry hosts is limited. The objective of this systematic review and meta-analysis was to summarize the up-to-date knowledge about the sero-viroprevalence of IBDV in wild birds on a global scale. A computerized literature research was performed on PubMed, Scopus, CAB Direct and Web of Science to find relevant publications, along with the screening of reference lists. Among 184 studies found, 36 original contributions met the pre-established criteria. A random-effect model was applied to calculate pooled seroprevalence estimates with 95% confidence intervals, whereas the paucity of virological studies (n = 6) only allowed a qualitative description of the data. The pooled seroprevalence was estimated to be 6% (95% C.I.: 3%-9%) and a high heterogeneity was detected (I²=96%). Sub-group analyses were not performed due to the scarcity of available information about hypothetical moderators. With respect to virological studies, IBDV was detected in *Anseriformes*, *Columbiformes*, *Galliformes*, *Passeriformes* and *Pelecaniformes*. With respect to serological data, our estimates showed a moderate exposure of wild birds to IBDV. Positive findings in different wild hosts underline the potential role of these species in the IBDV epidemiology at least as carriers or spreaders. Whilst a reservoir in wildlife could not be clearly identified, we believe this work provides useful insights for conducting future surveys which are needed to broaden the knowledge of IBDV occurrence in wild birds.

INTRODUZIONE

La bursite infettiva aviare o malattia di Gumboro è causata dall'*Infectious bursal disease virus* (IBDV) ed è considerata una malattia ad eziologia virale economicamente impattante per il settore avicolo industriale. Ad oggi ne sono riconosciuti due sierotipi: il sierotipo 1 che include ceppi patogeni per il pollo, ed il sierotipo 2, apatogeno per il pollame, naturalmente presente nel tacchino e segnalato in altre specie tra cui l'Eudipte ciuffodorato (*Eudiptes chrysolophus* (BRANDT, 1837)) e la Gru canadese (*Antigone canadensis* (LINNAEUS, 1758)) (Candelora et al., 2010; Gough et al., 2002). Indipendentemente dal ceppo considerato, l'IBDV determina, nel pollo, lesioni alla borsa di Fabrizio causando un'immunosoppressione tanto più rilevante tanto più giovane è l'animale al momento dell'infezione.

A partire dagli anni '80, l'evidenza di positività molecolari, virologiche o sierologiche ad IBDV è stata segnalata in diverse specie di uccelli a vita libera. Nonostante il

crescente numero di studi sull'interfaccia avicoli allevati/avifauna selvatica, ad oggi è ancora poco studiato l'eventuale ruolo degli uccelli selvatici nell'epidemiologia dell'IBDV. Questi ultimi, infatti, considerata la loro attitudine a migrare da una parte all'altra del globo, diversa a seconda delle specie e delle popolazioni, sono in grado di trasportare lungo le rotte migratorie anche gli eventuali patogeni di cui sono *reservoir* o *carrier*. Inoltre, alcune specie si sono adattate a vivere in ambienti antropizzati, nelle città o nei pressi di allevamenti, agendo da "ponte" tra queste aree e quelle più conservate dove sono presenti specie più schive (Patankar et al., 2021). Sulla base di queste premesse, qui presentiamo la prima revisione sistematica e meta-analisi delle attuali conoscenze riguardo la prevalenza sierovirologica dell'IBDV in avifauna selvatica su scala globale.

MATERIALI E METODI

Una revisione sistematica della letteratura ed una meta-analisi dei dati da questa estratti sono state eseguite per stimare la sieroviro-prevalenza dell'IBDV negli uccelli selvatici. Dato l'esiguo numero di studi molecolari o virologici rinvenuti, si è deciso di non analizzarli nell'insieme ma di descriverne qualitativamente i risultati ottenuti. Il Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses Protocols (PRISMA-P) (Moher et al., 2015) e il PRISMA 2020 Statement (Page et al., 2021) sono stati qui adottati in modo da adeguare il contenuto agli standard internazionali.

Ricerca bibliografica, selezione delle pubblicazioni ed acquisizione dei dati

Una prima fase del lavoro ha riguardato la ricerca bibliografica per il reperimento del materiale di interesse dalla letteratura. Sono quindi stati consultati un totale di quattro database online (PubMed, Scopus, CAB Direct, Web of Science) mediante le funzioni di ricerca avanzata e l'utilizzo di parole chiave e termini MeSH (Medical Subject Headings), in più sono state aggiunte manualmente ulteriori voci bibliografiche. I documenti ottenuti sono stati quindi inseriti in un foglio di Microsoft Excel (versione 16.49) e, dopo la rimozione degli studi duplicati, è stato effettuato uno screening dei lavori tramite l'applicazione ai relativi titoli ed abstract di specifici criteri di eleggibilità prestabiliti. Inoltre, non essendo stato eseguito alcun *publication bias assessment*, una sezione di "note" è stata inclusa nel foglio di calcolo Excel in modo da riportare qui eventuali elementi in grado di influire sulla qualità del dato riportato e quindi sulle successive analisi.

Analisi statistica

I dati acquisiti dagli studi selezionati sono stati analizzati statisticamente tramite il software R (versione 3.5.2) (R Core Team, 2018). Per quanto riguarda i risultati degli studi sierologici, le prevalenze sono state normalizzate usando il metodo *double-arc sine* (Miller, 1978). Dopo aver individuato e rimosso eventuali *outliers* tramite una *leave-one-out analysis*, la varianza tra gli studi è stata stimata tramite un *random effects method* applicato ad un *restricted maximum-likelihood estimator* (REML). L'eterogeneità risultante dall'analisi è stata infine quantificata tramite l'indice di inconsistenza (I^2) (Higgins & Thompson, 2002).

Riguardo i dati acquisiti dagli studi virologici/molecolari, non essendo di una consistenza numerica tale da poter realizzare una meta-analisi, ne è stata calcolata la prevalenza e stimato il 95% C.I. con il metodo "exact".

RISULTATI

Un totale di 184 pubblicazioni è stato reperito tramite ricerca bibliografica manuale ed online. In seguito alla rimozione dei duplicati delle pubblicazioni e all'applicazione dei criteri di eleggibilità prestabiliti, sono stati presi in considerazione per questa revisione sistematica e meta-analisi un totale di 36 contributi scientifici di cui $n = 33$ studi sierologici, $n = 6$ studi virologici e $n = 3$ studi sierovirologici.

Per quanto concerne gli studi sierologici, questi sono stati pubblicati tra il 1978 ed il 2020 ed hanno riguardato 20 aree del mondo con un totale di 7556 sieri di uccelli selvatici a vita libera analizzati e 1112 positività evidenziate. Il metodo più comunemente impiegato è stato l'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), sia con metodiche messe a punto e validate *in-house* sia kit commerciali validati per il pollame. La maggioranza degli studi ha riguardato i seguenti ordini di uccelli selvatici: *Sphenisciformes* (12/33 papers), *Passeriformes* (10/33), *Columbiformes* (9/33), e *Charadriiformes* (7/33), mentre la maggiore percentuale di positività sul totale di uccelli testati è stata rilevata per gli ordini *Falconiformes* (33.3%), *Anseriformes* (32.9%), *Gruiformes* (32.7%), *Sphenisciformes* (16.8%), *Accipitriformes* (12.9%) e *Charadriiformes* (11.1%). Dopo la *leave-one-out analysis*, le pubblicazioni di Dwight et al. (2018), Hollmén et al. (2000) e Miller & Shellam (2007) sono state escluse. La *pooled seroprevalence* stimata in seguito alla rimozione degli studi *outliers* è risultata del 6% (95% C.I.: 3-9%) (Figura 1).

Riguardo i lavori in cui sono state impiegate metodiche diagnostiche virologiche/molecolari, questi coprono un range temporale dal 2009 e il 2020 e riguardano 6 paesi del mondo con un totale di 244 animali campionati e 10 casi positivi. Per la ricerca molecolare di IBDV la borsa di Fabrizio è stato l'organo maggiormente campionato e la *reverse-transcriptase* PCR il metodo impiegato. Un totale di 8 sequenze ottenute dai casi di positività è stato depositato dai rispettivi Autori in GenBank (Tabella 1). In alcuni studi, le sequenze virali provenienti da avifauna selvatica si sono dimostrate essere in stretta relazione filogenetica con ceppi *very virulent* isolati nel pollo (Jeon et al., 2008; Kasanga et al. 2008; Naggar et al. 2020) oppure con ceppi vaccinali (Naggar et al., 2020). Sono stati inoltre rinvenuti dei residui amminoacidici unici nella *hypervariable region* della *viral protein 2* (HVR-VP2) di alcuni isolati da uccelli selvatici (Kasanga et al., 2008; Naggar et al., 2020).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ad oggi questa è la prima revisione sistematica e meta-analisi sulla circolazione di IBDV in avifauna selvatica su scala globale. Riguardo la *pooled seroprevalence*, la stima derivante dall'insieme degli studi considerati è del 6% (95% C.I.: 3-9%) ed indica una moderata esposizione all'IBDV in avifauna selvatica. La presenza di una elevata eterogeneità ($I^2=96\%$) suggerisce che la variabilità osservata tra gli studi non è imputabile al caso, ma all'esistenza di variabili che non è stato possibile esplorare mediante *sub-group analysis* per carenza di dati disponibili.

Riguardo la diagnosi diretta di IBDV, l'isolamento in avifauna selvatica di ceppi correlati a *very virulent* IBDV o a ceppi vaccinali indica l'esistenza di un contatto, a livello di interfaccia, tra domestico e selvatico. Il rinvenimento poi di nuovi residui amminoacidici nella HVR-VP2 in alcuni isolati da uccelli selvatici suggerisce che i ceppi di IBDV in questi ospiti possono andare incontro a mutazioni e quindi contribuire all'evoluzione virale.

Considerati i risultati ottenuti con questa revisione sistematica e meta-analisi, sarebbe auspicabile ampliare e continuare le indagini epidemiologiche sulla circolazione di IBDV negli uccelli selvatici dando la priorità alle specie più frequentemente rinvenute nei pressi degli allevamenti. In questa direzione sarebbe utile combinare metodi di diagnosi diretta ed indiretta nella stessa popolazione di studio, sfruttando anche eventuali campagne di inanellamento tenute da ornitologi specializzati o momenti di sorveglianza attiva di malattie denunciabili quali l'Influenza aviaria. Risulterebbe opportuna poi l'adeguata acquisizione delle informazioni sulla classe di sesso e sulle classi di età degli individui campionati, in modo da avere gli elementi utili per caratterizzarne l'eventuale significato nell'epidemiologia virale.

Figura 1. Forest plot della meta-analisi della prevalenza sierologica dell'IBDV in avifauna selvatica. I^2 (indice di inconsistenza), τ^2 = varianza tra gli studi, χ^2 and p -value del Cochrane's Q test per l'eterogeneità.

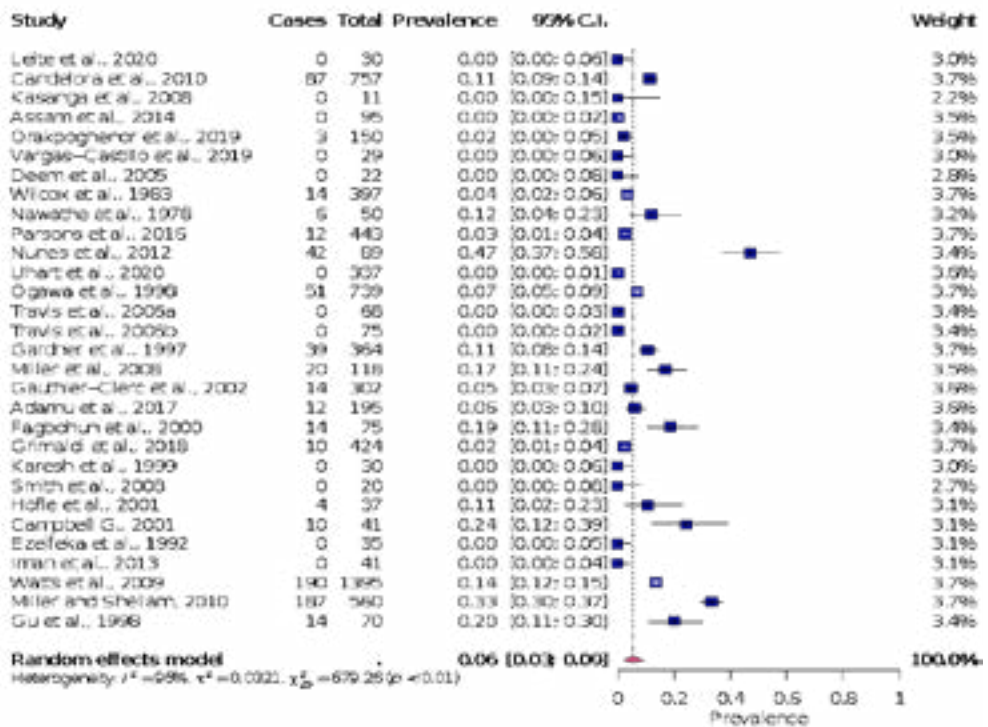


Tabella 1. Sintesi degli studi virologici/molecolari sulla ricerca dell'IBDV in uccelli selvatici.

Autori	Area di studio	Periodo di studio	Campione	GenBank accession number	Identificazione dell'ospite	Prevalenza % (95% C.I.)
Naggar et al., 2020	Northern Africa	2019	Tampone cloacale	MT304668 MT304670	<i>Anseriformes</i> , <i>Pelecaniformes</i> , <i>Galliformes</i>	10.7 (0%-20%)
Vargas-Castillo et al., 2018	South America	2012-2013	Tampone cloacale	-	<i>Apodiformes</i> , <i>Columbiformes</i> , <i>Passeriformes</i>	0
Curland et al., 2018	Western Europe	2011-2014	Borsa di Fabrizio	-	<i>Galliformes</i>	3.8 (0%-11%)
Watts et al., 2009	Antarctica	2000	Borsa di Fabrizio	-	<i>Sphenisciformes</i>	0 ^a
Kasanga et al., 2008	Eastern Africa	2005	Borsa di Fabrizio	AB306716	<i>Galliformes</i>	9.1 (8%-27%)
Jeon et al., 2008	Eastern Asia	2006-2007	Tonsille cecali	EU493342 EU493343 EU493345 EU493344 EU493341	<i>Anseriformes</i> , <i>Charadriiformes</i> , <i>Columbiformes</i> , <i>Passeriformes</i>	4.7 (0.7%-9%)

BIBLIOGRAFIA

1. Adamu, H. U., Balami, A. G., Abdu, P. A. (2017). Avian influenza, Gumboro and Newcastle disease antibodies and antigens in apparently healthy wild birds in Kano Metropolis, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 38, 69-77.
2. Assam, A., Abdu, P. A., Ademola, A. O., Augustine, E., & Lawal, S. (2014). Avian influenza, Newcastle and Gumboro disease antibodies and antigens in apparently healthy wild birds in Kaduna state, Nigeria. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 62.
3. Campbell, G. (2001). Investigation into evidence of exposure to infectious bursal disease virus and infectious anaemia virus in wild birds in Ireland. In: E. F. Kaleta, H. R. Ursula, H. Lange-Herbs (Eds.). *Proceedings of the II International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia, Rauschholzhausen, Germany* (pp. 230–235).
4. Candelora, K. L., Spalding, M. G., & Sellers, H. S. (2010). Survey for antibodies to infectious bursal disease virus serotype 2 in wild turkeys and Sandhill Cranes of Florida, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(3), 742-52.
5. Curland, N., Gethöffer, F., van Neer, A., Ziegler, L., Heffels-Redmann, U., Lierz, M., Baumgärtner, W., Wohlsein, P., Völker, I., Lapp, S., ..., Siebert, U. (2018). Investigation into diseases in free-ranging ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) in northwestern Germany during population decline with special reference to infectious pathogens. *European Journal of Wildlife Research*, 64(12).

6. Deem, S. L., Noss, A. J., Cuéllar, R. L., & Karesh, W. B. (2005). Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran chaco, Bolivia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 36(4), 598–605.
7. Dwight, I. A., Coates, P. S., Stoute, S. T., Senties-Cue, C. G., Gharpure, R. V., & Pitesky, M. E. (2018). Serologic Surveillance of Wild and Pen-reared Ring-necked Pheasants (*Phasianus colchicus*) as a method of understanding disease reservoirs. *Journal of wildlife diseases*, 54(2), 414–418.
8. Ezeifeke, G. O., Dowoh, S. K., & Umoh, J. U. (1992). Involvement of wild and domestic birds in the epidemiology of Newcastle disease and Infectious bursal disease in Zaria, Nigeria. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 40(2), 125-127.
9. Fagbohun, O. A., Owoade, A. A., Oluwayelu, D. O., Olayemi, F. O. (2000). Serological survey of infectious bursal diseases virus antibodies in cattle egrets, pigeons and Nigerian laughing doves. *African Journal of Biomedical Research*, 3.
10. Gardner, H., Kerry, K., Riddle, M., Brouwer, S., & Gleeson, L. (1997). Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature*, 387(6630), 245.
11. Gauthier-Clerc, M., Eterradossi, N., Toquin, D., Guittet, M., Kuntz, G., & Le Maho, Y. (2002). Serological survey of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*, in Crozet Archipelago for antibodies to infectious bursal disease, influenza A and Newcastle disease viruses. *Polar Biology*, 25, 316–319.
12. Gough, R. E., Drury, S. E., Welchman Dde, B., Chitty, J. R., & Summerhays, G. E. (2002). Isolation of birnavirus and reovirus-like agents from penguins in the United Kingdom. *Veterinary Records*, 151(14), 422-424.
13. Grimaldi, W., Ainley, D. G., & Massaro, M. (2018). Multi-year serological evaluation of three viral agents in the Adélie Penguin (*Pygoscelis adeliae*) on Ross Island, Antarctica. *Polar Biology*, 41.
14. Gu, F., Li, S., Ye, X., & Liu, R. (1998) Serological investigation and artificial infection of guinea-fowls and pheasants with infectious bursal disease. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 28(1), 22-23.
15. Higgins, J. P. T., & Thompson, S. G. (2002). Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statistics in Medicine*, 21, 1539-1558.
16. Höfle, U., Blanco, J. M., & Kaleta, E. F. (2001, 16-20 June). Neutralizing antibodies against infectious bursal disease virus in sera of free living and captive birds of prey from central Spain (preliminary results). In: E. F. Kaleta, H. R. Ursula, & H. Lange-Herbs (Eds.). *Proceedings of the II International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia, Rauschholzhausen, Germany* (pp. 247–251).
17. Hollmén, T., Franson, J. C., Docherty, D. E., Kilpi, M., Hario, M., Creekmore, L. H., & Petersen, M. R. (2000). Infectious Bursal Disease Virus antibodies in Eider Ducks and Herring Gulls. *The Condor*, 102(3), 688–691.
18. Iman, M. E., Faki, A. E., AlHassan, A. M., Selma, O. A., Egbal, S. A., Rahim, J. I., Esmat, E. (2013). Microbiological and serological studies of some poultry pathogens in wild birds in Sudan. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 61.
19. Jeon, W. J., Lee, E. K., Joh, S. J., Kwon, J. H., Yang, C. B., Yoon, Y. S., & Choi, K. S. (2008). Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild

- birds in Korea: epidemiological implications. *Virus Research*, 137(1), 153-156.
20. Karesh, W. B., Uhart, M. M., Frere, E., Gandini, P., Braselton, W. E., Puche, H., & Cook, R. A. (1999). Health evaluation of free-ranging rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocomes*) in Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30(1), 25-31.
 21. Kasanga, C. J., Yamaguchi, T., Munang'andu, H. M., Ohya, K. & Fukushi, H. (2013). Molecular epidemiology of infectious bursal disease virus in Zambia. *Journal of the South African Veterinary Association*, 84.
 22. Leite, A. T. M., Fischer, G., Hübner, S. de O., Lima, M. de., Vargas, G. D. (2020). Investigation of impact viruses in poultry health of wild birds near a free range poultry farm in Pelotas, RS. *Science and Animal Health*, 8, 73-87.
 23. Miller, J. J. (1978). The Inverse of the Freeman – Tukey Double Arcsine Transformation. *The American Statistician*, 32(4), 138.
 24. Miller, G. D., & Shellam, G. R. (2007, September 3-7). *Disease status of penguins on Macquarie Island* [Poster]. 6th international penguin conference, 2007, Hobart, Tasmania, Australia.
 25. Miller, G. D., & Shellam, G. R. (2010, August 29-September 3). *Seasonal prevalence of viral antibodies in emperor penguins at Auster Colony, Antarctica* [Poster]. 7th international penguin conference, 2010, Boston, Massachusetts, United States.
 26. Miller, G. D., Watts, J., & Shellam, G. (2008). Viral antibodies in south polar skuas around Davis Station, Antarctica. *Antarctic Science*, 20(5), 455-461.
 27. Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., & Stewart, L.A. (2015). Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic Reviews*, 4(1).
 28. Naggar, R. F. E., Rohaim, M. A., & Munir, M. (2020). Potential reverse spillover of infectious bursal disease virus at the interface of commercial poultry and wild birds. *Virus Genes*, 56(6), 705-711.
 29. Nawathe, D. R., Onunkwo, O., & Smith, I. M. (1978). Serological evidence of infection with the virus of infectious bursal disease in wild and domestic birds in Nigeria. *The Veterinary record*, 102(20), 444.
 30. Nunes, C. F., Fonseca, F., Leite, A. T. M., da Silva Filho, R. P., Fonseca Finger, P., Castro, C. C., Fischer, G., D'ávila Vargas, G., & de Oliveira, H. S. (2012). Investigation on Newcastle Disease Virus (NDV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) and Avian Poxvirus (APV) in magellanic penguins in Southern region of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4).
 31. Ogawa, M., Wakuda, T., Yamaguchi, T., Murata, K., Setiyono, A., Fukushi, H., & Hirai, K. (1998). Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 60(11), 1277-1279.
 32. Orakpoghenor, O., Oladele, S. B., & Abdu, P. A. (2020). Research Note: Detection of infectious bursal disease virus antibodies in free-living wild birds in Zaria, Nigeria. *Poultry science*, 99(4), 1975–1977.
 33. Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting sys-

- tematic reviews. *British Medical Journal*, 372(71).
34. Parsons, N. J., Gous, T. A., Schaefer, A. M., & Vanstreels, R. E. (2016). Health evaluation of African penguins (*Spheniscus demersus*) in southern Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 83(1).
 35. Patankar, S., Jambhekar, R., Suryawanshi, K. R., & Nagendra, H. (2021). Which Traits Influence Bird Survival in the City? A Review. *Land*, 10(2), 92.
 36. R Core Team (2018). *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
 37. Smith, K. M., Karesh, W. B., Majluf, P., Paredes, R., Zavalaga, C., Reul, A. H., Stetter, M., Braselton, W. E., Puche, H., & Cook, R. A. (2008). Health evaluation of free-ranging Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) in Peru. *Avian Diseases*, 52(1), 130-135.
 38. Travis, E. K., Vargas, F. H., Merkel, J., Gottdenker, N., Miller, R. E., Parker, P. G. (2006a). Hematology, plasma chemistry, and serology of the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*) in the Galapagos Islands, Ecuador. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 133-141.
 39. Travis, E. K., Vargas, F. H., Merkel, J., Gottdenker, N., Miller, R. E., & Parker, P. G. (2006b). Hematology, serum chemistry, and serology of Galápagos penguins (*Spheniscus mendiculus*) in the Galápagos Islands, Ecuador. *Journal of wildlife diseases*, 42(3), 625–632.
 40. Uhart, M., Thijl Vanstreels, R. E., Gallo, L., Cook, R. A., Karesh, W. B. (2020). Serological survey for select infectious agents in wild magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) in Argentina, 1994-2008. *Journal of Wildlife Diseases*, 56(1), 66-81.
 41. Vargas-Castillo, L., Soler-Tovar, D., Gómez, A. P., & Santander, A. F., Benavides, E., & Villamil Jiménez, L. C. (2019). Evaluation of viral agents in wild birds of the Middle-East of Colombia. *Ornitologia Colombiana*, 17.
 42. Watts, J. M., Miller, G. D., & Shellam, G. R. (2009). Infectious Bursal Disease Virus and Antarctic Birds. In: K. R. Kerry, & M. Riddle. (Eds). *Health of Antarctic Wildlife*. Berlin, Heidelberg: Springer.
 43. Watts, J. M., Miller, G. D., & Shellam, G. R. (2009). Infectious Bursal Disease Virus and Antarctic Birds. In: K. R. Kerry, & M. Riddle. (Eds). *Health of Antarctic Wildlife*. Berlin, Heidelberg: Springer.
 44. Wilcox, G. E., Flower, R. L., Baxendale, W., & Mackenzie, J. S. (1983). Serological survey of wild birds in Australia for the prevalence of antibodies to egg drop syndrome 1976 (EDS-76) and infectious bursal disease viruses. *Avian Pathology*, 12(1), 135-139.

STUDIO FENOTIPICO E GENOTIPICO DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLA COLISTINA DI *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA INFANTIS* ISOLATI IN POLLI DA CARNE

Musa L.¹, Casagrande Proietti P.¹, Stefanetti V.¹, Toppi V.¹, Marenzoni M. L.¹, Shtylla Kika T.², Blasi F.³, Branciarri R.¹, Franciosini M. P.¹

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia;

²Facolta' di Medicina Veterinaria, Università Agricola di Tirana, Tirana, Albania;

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', 06124 Perugia, Italy.

Summary

Colistin has been recently reassessed as a last-line treatment option in the therapeutic treatment against multidrug resistant bacteria in humans. The main objective of our research was to investigate the susceptibility of *E. coli* and *S. Infantis* to colistin in broiler chickens, as these microorganisms are considered of interest in Public Health. Another purpose was to determine the spread of ESBL (Producing Broad-Spectrum β -Lactamase) bacteria following the alarmism related to possible transmission to man, directly or through the consumption of meat chicken derived products. Our results showed that all *E. coli* were colistin-susceptible and *mcr* negative. Three isolates of *S. Infantis* were *mcr* positive and colistin resistant, showing a MIC range of 4-8 mg/L. The low prevalence of resistance is likely due to both a different susceptibility of *Salmonella* spp to colistin and to an off label (or restricted) use of this antimicrobial in poultry. The WGS (whole genome sequence) evidenced in two strains *mcr*-1.2. variant. To our knowledge is the first report of this variant in meat chickens. The ESBL prevalence, high for both *E. coli* (24,1%) and *S. Infantis* (82,3%) justifies the progressive concern for the safety of the chicken by- products meat.

INTRODUZIONE

La colistina appartenente alla classe delle polimixine è un antibiotico attivo nei confronti di numerosi batteri gram negativi ed è stato usato in Medicina Veterinaria per lungo tempo non solo come agente terapeutico e preventivo nelle infezioni da Gram-negativi (Kieffer et al., 2017) ma anche come promotore di crescita in alcune specie di interesse zootecnico (Rhouma et al., 2016; Kumar et al., 2020). Il manifestarsi di forme resistenza nel corso del tempo ne ha causato una limitazione dell'impiego, che attualmente nel pollame è in deroga e subordinato solo a quei casi in cui gli antibiotici testati risultano inefficaci nei confronti del microorganismo isolato.

Recentemente, dopo un periodo di sospensione del suo impiego in umana per i possibili effetti nefrotossici (Lim et al., 2010), si è assistito ad un rinnovato interesse per la colistina come antibiotico "last resort" (di ultima scelta) in Medicina Umana da impiegare in corso di infezioni sostenute da batteri gram negativi multiresistenti, soprattutto *Enterobacteriaceae* (Biswas et al, 2012; Azzopardi et al., 2013; Poirel et al., 2017). La World Health Organization (WHO, 2018) pertanto ha riclassificato la colistina nella categoria di farmaci di importanza critica per la medicina Umana,

giustificando l'esecuzione di più frequenti studi di monitoraggio della resistenza nei confronti di questa molecola mostrata da alcuni batteri tra i quali *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diffusi in campo umano e veterinario. Nell'ambito della popolazione di Salmonelle, *S. Infantis* è considerata un sierotipo emergente a livello europeo, particolarmente diffusa lungo l'intera filiera avicola, non solo negli allevamenti di broiler, ma anche negli allevamenti di tacchini e nei prodotti derivati, configurandosi come il sierotipo più diffuso dopo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (EFSA, 2019). Recentemente la resistenza alla colistina è stata attribuita al gene, plasmide-mediato, *mcr 1* descritto nel 2015 per la prima volta in *E. coli* (Liu et al., 2016). Da allora in quasi tutti i Paesi del mondo sono stati rilevati i geni *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* con le loro varianti e subvarianti in ceppi di *E. coli* e *Salmonella* ssp. isolati nell'uomo, animali ed alimenti di origine animale, a testimonianza della continua evoluzione del meccanismo di resistenza genetica a questa molecola (Borowiak et al., 2017; Kawanishi et al., 2017; Yin et al., 2017; Carfora et al., 2018; Portes et al., 2021). Recentemente in ceppi di *S. Typhimurium* isolati da suini e vitelli è stato evidenziato anche il gene *mcr-9*. (Diaconu et al., 2021). Obiettivi del presente lavoro sono stati l'analisi fenotipica della suscettibilità alla colistina, la determinazione di ESBL e la valutazione genotipica della presenza del gene *mcr* in ceppi di *E. coli* e *S. Infantis* isolati da polli da carne.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Un totale di 174 ceppi di *E. coli* (Centro Italia, 2019-2020) e 85 ceppi di *Salmonella* *Infantis* (Nord, Centro e Sud Italia, 2016-2019) sono stati isolati da polli da carne broiler *Ross 308* in allevamento e alla macellazione nell'arco temporale 2019-2020. I ceppi di *E. coli* provenienti dall'allevamento ($n = 81$) sono stati isolati da campioni cloacali e campioni ambientali, i ceppi provenienti alla macellazione ($n = 93$) sono stati isolati da campioni cutanei e contenuto cecale. I ceppi di *S. Infantis* sono stati isolati in allevamento (campioni cloacali) ($n=13$) e alla macellazione (campioni ambientali, campioni cutanei, fegato e prodotti lavorati) ($n=72$).

Isolamento e identificazione di E. coli e S. Infantis

L'isolamento di *E. coli* e *S. Infantis* è stato eseguito secondo le metodiche tradizionali. Tutte le colonie con morfologia tipica di *E. coli* sono state selezionate e confermate da test biochimici (ISO). L'identificazione di *S. Infantis* è stata eseguita mediante la tipizzazione sierologica (IZS dell'Umbria e delle Marche).

Test di suscettibilità antimicrobica e determinazione di ESBL degli isolati di E. coli e S. Infantis

La suscettibilità antimicrobica è stata testata mediante determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) utilizzando il metodo di microdiluizione in piastra (FRCOL plates, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) con concentrazioni scalari di colistina. Per tutti i ceppi di *E. coli* e *S. Infantis* la produzione di ESBL è stata confermata dal test sinergico a doppio disco (DDST) e tramite la microdiluizione in piastra (Sensititre™ ESBL plates, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy). I risultati sono stati valutati mediante i breakpoint di EUCAST. (>2 mg/L). Il profilo fenotipico di antibiotico-resistenza degli isolati di *S. Infantis* è stato valutato mediante il test di Kirby-Bauer ed i risultati sono stati pubblicati in uno studio precedente (Casagrande Proietti et al., 2020). In tutti gli isolati di *E. coli* è stata eseguita l'analisi fenotipica del profilo di

antibiotico-resistenza mediante microdiluizione in piastra (MIC) (dati non pubblicati).

Multiplex PCR

Il DNA genomico è stato estratto dalle colonie utilizzando il kit GenElute™Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania) secondo il protocollo del produttore. I campioni sono stati analizzati tramite spettrofotometro e mediante l'elettroforesi su gel di agarosio all'1% per determinare rispettivamente la quantità e la qualità del DNA estratto. L'amplificazione mediante Multiplex PCR dei geni *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* è stata eseguita come precedentemente riportato nello studio di Rebelo et al., (2018). L'elettroforesi su gel è stata utilizzata per l'analisi dei prodotti della PCR, utilizzando gel di agarosio a 1,2%.

Sequenziamento genomico (WGS)

Un nanogrammo di DNA genomico è stato utilizzato per la preparazione delle librerie, utilizzando il kit Illumina Nextera XT. Dopo normalizzazione, le librerie sono state sequenziate su piattaforma Illumina MiSeq in paired-end (2x300 cicli). Il dato grezzo di sequenziamento è stato valutato con il software FastQC, e le sequenze con qualità inferiore a 20 (Phred Score) e/o lunghezza inferiore a 70 nucleotidi sono state rimosse. L'assemblaggio è stato effettuato con il software Spades v. 3.14 e trattenuti solo gli scaffolds più lunghi di 200 nucleotidi. Le sequenze genomiche ottenute sono state valutate con il software Quast ed annotate con Prokka. I geni di antibiotico-resistenza e la presenza di repliconi plasmidici sono stati identificati con il software STARAMR.

RISULTATI

Test suscettibilità antimicrobica alla colistina ed ESBL (Beta-lattamasi a spettro esteso)

I ceppi di *E. coli* sono risultati tutti sensibili alla colistina (MIC range, 0.5–1 mg/L). Per quanto concerne *S. Infantis*, 3 ceppi (3,5%) hanno mostrato resistenza alla colistina. Un ceppo isolato dalla pelle del collo di un broiler nel 2016 in un macello del sud Italia ha mostrato una MIC di 4 mg/L, gli altri due ceppi isolati nel 2017 al macello da fusi di polli provenienti da allevamenti del Nord Italia hanno presentato una MIC pari a 8 mg/L. La MIC degli isolati suscettibili alla colistina è oscillata da 0,5 -1 mg/L solo in 1 ha mostrato valori di 2 mg/L. Quarantadue /174 (24,1 %) isolati di *E. coli* 85 (82,3%) ceppi di *S. Infantis* erano ESBL positivi. I risultati relativi al profilo fenotipico di antibiotico-resistenza dei 3 ceppi di *S. Infantis* colistina-resistenti sono riportati in tabella 1.

Multiplex PCR

In tutti gli isolati di *E. coli* non sono stati rilevati i geni *mcr-1/ mcr-5*. I tre isolati di *S. Infantis* colistina- resistenti hanno presentato il gene *mcr- 1*.

Sequenziamento genomico (WGS)

I risultati del profilo genotipico dell'antibiotico-resistenza sono illustrati in tabella 1. In merito al gene *mcr-1* in un isolato è stata rilevata la variante *mcr-1.1*, in due isolati è stata evidenziata la variante *mcr-1.2*. Tutti gli isolati presentavano anche i geni *bla*CTX-M-1 che media la resistenza al cefotaxime, *sul 1*, (resistenza ai sulfamidici) *tet(A)* (resistenza alla tetraciclina) e *df*rA1, *df*rA14 che mediano la resistenza al trimetoprim. In 2 ceppi sono stati evidenziati anche il gene *aph(3')*-Ia (resistenza agli aminoglicosidi), i geni *gyrA* (D87G) e *parC* che mediano la resistenza ai chinoloni e *qacE* (resistenza ai quaternari) rispettivamente.

Tabella 1: Profilo genotipico e fenotipico di 3 isolati di *S. Infantis* colistina-resistenti

N.	Origine	Matrice	Anno	Profilo genotipico AMR	Profilo fenotipico AMR
1	Sud Italia	Pelle del collo (macello)	2016	<i>bla</i> CTX-M-1, <i>sul</i> 1, <i>tet</i> (A), <i>mcr</i> 1.1, <i>dfr</i> A1, <i>dfr</i> A14	ACIColCtxCzFpSxtTe
2	Nord Italia	Fusi di pollo (macello)	2017	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>bla</i> CTX-M-1, <i>dfr</i> A1, <i>dfr</i> A14, <i>gyr</i> A (D87G), <i>mcr</i> -1.2, <i>par</i> C (T57S), <i>qac</i> E, <i>sul</i> 1, <i>tet</i> (A)	ACIColCpCtxFpNaSxtTe
3	Nord Italia	Fusi di pollo (macello)	2017	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>bla</i> CTX-M-1, <i>dfr</i> A1, <i>dfr</i> A14, <i>gyr</i> A (D87G), <i>mcr</i> -1.2, <i>par</i> C (T57S), <i>qac</i> E, <i>sul</i> 1, <i>tet</i> (A)	ACIColCtxFpNaSxtTe

A=ampicillina, Cl=cefalexina, Col=Colistina, Cp=ciprofloxacina, Ctx=cefotaxime, Cz=ceftazidime, Fp=cefepime, Na=acido nalidixico, Sxt=trimetoprim + sulfametossazolo, Te=tetraciclina

DISCUSSIONE

In relazione alla rivalutazione dell'uso in Medicina Umana della colistina, come ultima opzione nel trattamento di super infezioni, sostenute in special modo da gram negativi (Andrade et al., 2020), il principale obiettivo della nostra ricerca è stato quello di valutare nei polli da carne la suscettibilità di isolati di *E. coli* e *S. Infantis* alla colistina, in quanto microrganismi considerati significativi in campo umano e veterinario. Altro scopo è stato quello di determinare la diffusione di *E.coli* e *Salmonella* spp ESBL in risposta all'allarmante incremento di infezioni causate da *Enterobacteriaceae* produttrici di β -lattamasi ad ampio spettro in umana. Nel nostro lavoro 3 isolati su 85 (3,5%) provenienti da polli da carne al macello sono risultati resistenti con valori di MIC oscillanti di 4-8 mg/L. In un precedente lavoro Carfora et al., (2018) hanno evidenziato in polli da carne una prevalenza di resistenza alla colistina da parte di *S. Infantis* di 1,2%

Agero et al (2012) avevano precedentemente riportato distribuzioni di MIC nei confronti della colistina per isolati di *Salmonella* appartenenti a diversi sierotipi, con *S. Dublin* e *S. Enteritidis*, che presentavano valori di MIC più elevati rispetto ad altri sierotipi, quali *S. Typhimurium* e *S. Infantis*. Dati confermati successivamente anche da studi di monitoraggio condotti da EFSA (2014) su polli da carne e

galline ovaiole che hanno mostrato che gli isolati di *Salmonella* spp. resistenti alla colistina appartenevano perlopiù a *S. Enteritidis*, la quale mostrava una resistenza intrinseca a questa molecola, attribuita di recente ad una differenza nell'espressione dell'antigene somatico (Ricci et al., 2020). Va inoltre ricordato che dati relativi alla resistenza della *Salmonella* spp. a colistina possono variare anche in relazione all'area geografica in virtù del differente impiego di questo farmaco (EMA, 2016; Apostolakos et al., 2018). Il sequenziamento completo dei 2 isolati di *S. Infantis* resistenti alla colistina ha dimostrato la presenza del gene *mcr* 1.2, descritto in primis in Toscana nel plasmide IncX4 su un isolato di *Klebsiella pneumoniae* proveniente dall'uomo (Di Pilato et al., 2016). Successivamente questa variante sempre associata al plasmide IncX4 è stata riscontrata a livello di *S. Blockley* e *E. coli* intestinali nel tacchino all'ingrasso (Alba et al., 2018). A nostra conoscenza questa è la prima segnalazione della variante *mcr* 1.2 nel pollo. La capacità delle "cassette" geniche *mcr* di muoversi da un plasmide all'altro (IncI2, IncX4, IncHI2, and IncP) e/o all'interno del cromosoma è estremamente significativo ai fini di una possibile inserzione in plasmidi presenti in isolati multiresistenti e anche di una "creazione" di megaplasmidi come documentato in Italia da Franco et al. (2015) in *S. Infantis* e successivamente in Svizzera (Hindermann et al., 2017) e negli Stati Uniti (Tate et al., 2017). Studi condotti su isolati ESBL resistenti alla colistina di *S. Infantis* provenienti broiler e prodotti derivati ha messo in evidenza la presenza della variante *mcr* 1.1 (Carfora et al., 2018). Un elevato numero di isolati di *Salmonella* spp (70/85) è risultato ESBL, inclusi i 3 isolati resistenti alla colistina, seppure queste caratteristiche non risultano necessariamente associate come evidenziato già in un precedente lavoro (Casagrande Proietti et al., 2020). Tutti i ceppi di *E. coli* sono risultati suscettibili alla colistina e negativi per la presenza dei geni *mcr* 1-*mcr* 5. In studi recenti eseguiti in Italia da Alba et al., (2018), Niero et al., (2018) e Pesciaroli et al. (2019), su ceppi di *E. coli* isolati da polli da carne è emerso che la prevalenza di resistenza alla colistina è rispettivamente del 5,9%, 2% e 1,8%. In generale nei Paesi dell'Unione Europea la prevalenza di resistenza alla colistina da parte di *E. coli* risulta tendenzialmente bassa sebbene si possano avere delle variazioni in relazione al maggiore uso del farmaco in alcuni stati membri (EFSA 2017). Nel nostro lavoro il numero degli ESBL è risultato alto anche per *E. coli*, (42 su 174) come già riportato per *Salmonella* spp, a testimonianza che il pollo sia una potenziale fonte di trasmissione diretta o indiretta, attraverso il consumo dei suoi prodotti, per l'uomo (Lazarus et al., 2014).

CONCLUSIONI

I nostri risultati hanno messo in evidenza globalmente una resistenza moderata alla colistina da parte degli isolati di *S. Infantis*, in linea con quanto riportato in letteratura, dovuto in parte all'attento uso di questa molecola nel settore veterinario e a una diversa suscettibilità esibita dalle varie specie di *Salmonella*. Il sequenziamento completo del genoma ha messo in evidenza la variante *mcr* 1.2 finora non descritta nel pollo da carne che testimonia la complessità genetica, in continua evoluzione, tipica della resistenza a questo principio attivo. In ultimo l'elevato numero di *E. coli* e *Salmonelle* ESBL riscontrato soprattutto al mattatoio conferma la preoccupazione per la sicurezza del prodotto finale per il consumatore.

BIBLIOGRAFIA

1. Agero Y, Torpdahl M, Zachariasen C, Seyfarth A, Hammerum AM, Nielsen EM. 2012. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis* 9:367–369. doi:10.1089/fpd.2011.1015.
2. Alba P, Leekitcharoenphon P, Franco A, Feltrin F, Ianzano A, Caprioli A, Stravino F, Hendriksen RS, Bortolaia V, Battisti A. Molecular Epidemiology of Mcr-Encoded Colistin Resistance in Enterobacteriaceae From Food-Producing Animals in Italy Revealed Through the EU Harmonized Antimicrobial Resistance Monitoring. *Front. Microbiol.* 2018, 0 (JUN), 1217. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01217>.
3. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms* 2020, 8 (11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111716>.
4. Apostolakos I, Piccirillo A. A Review on the Current Situation and Challenges of Colistin Resistance in Poultry Production. *Avian Pathol.* 2018, 47 (6), 546–558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1524573>.
5. Azzopardi EA, Ferguson EL, Thomas DW. Colistin Past and Future: A Bibliographic Analysis. *J. Crit. Care* 2013, 28 (2), 219.e13-219.e19. <https://doi.org/10.1016/J.JCRC.2012.04.008>.
6. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2012, 10 (8), 917–934. <https://doi.org/10.1586/ERI.12.78>.
7. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a Novel Transposon-Associated Phosphoethanolamine Transferase Gene, Mcr-5, Conferring Colistin Resistance in d-Tartrate Fermenting *Salmonella* Enterica Subsp. Enterica Serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, 72 (12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX327>.
8. Carfora V, Alba P, Leekitcharoenphon P, Ballarò D, Cordaro G, Di Matteo P, Donati V, Ianzano A, Iurescia, M, Stravino F, Tagliaferri T, Battisti A, Franco A. Colistin Resistance Mediated by Mcr-1 in ESBL-Producing, Multidrug Resistant *Salmonella* Infantis in Broiler Chicken Industry, Italy (2016–2017). *Front. Microbiol.* 2018, 0 (AUG), 1880. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01880>.
9. Countries should reduce use of colistin in animals to decrease the risk of antimicrobial resistance | European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/en/news/countries-should-reduce-use-colistin-animals-decrease-risk-antimicrobial-resistance> (accessed Aug 23, 2021).
10. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM. Mcr-1.2, a New Mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60 (9), 5612–5615. <https://doi.org/10.1128/AAC.01075-16>.
11. Diaconu EL, Alba P, Feltrin F, Matteo P. Di; Iurescia, M.; Chelli, E.; Donati, V.; Marani, I.; Giacomini, A.; Franco, A.; Carfora, V. Emergence of IncHI2 Plasmids With Mobilized Colistin Resistance (Mcr)-9 Gene in ESBL-Producing, Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium and Its Monophasic Variant ST34 From Food-Producing Animals in Italy. *Front. Microbiol.* 2021, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.705230>.

12. EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics https://eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed Sep 1, 2021).
13. Franco A, Leekitcharoenphon P, Feltrin F, Alba P, Cordaro G, Iurescia M, Tolli R, D’Incau M, Staffolani M, Giannatale Edi, Hendriksen RS, Battisti A. Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* *Infantis* Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS One* 2015, 10 (12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144802>.
14. Hindermann D, Gopinath G, Chase H, Negrete F, Althaus D, Zurfluh K, Tall BD, Stephan R, Nüesch-Inderbilen M. *Salmonella* Enterica Serovar *Infantis* from Food and Human Infections, Switzerland, 2010–2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. *Front. Microbiol.* 2017, 0 (JUL), 1322. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01322>.
15. ISO - ISO 16649-1:2018 - Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuron <https://www.iso.org/standard/64951.html> (accessed Sep 30, 2021).
16. Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, Shima A, Yamashita A, Sekizuka T, Kato K, Kuroda M, Koike R, Kijima M. Prevalence of Colistin Resistance Gene *Mcr-1* and Absence of *Mcr-2* in *Escherichia Coli* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61 (1). <https://doi.org/10.1128/AAC.02057-16>.
17. Kieffer, N.; Aires-de-Sousa, M.; Nordmann, P.; Poirel, L. High Rate of *MCR-1*-Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* among Pigs, Portugal - Volume 23, Number 12—December 2017 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23 (12), 2023–2029. <https://doi.org/10.3201/EID2312.170883>.
18. Kumar, H.; Chen, B.-H.; Kuca, K.; Nepovimova, E.; Kaushal, A.; Nagraik, R.; Bhatia, S. K.; Dhanjal, D. S.; Kumar, V.; Kumar, A.; Upadhyay, N. K.; Verma, R.; Kumar, D. Understanding of Colistin Usage in Food Animals and Available Detection Techniques: A Review. *Anim.* 2020, Vol. 10, Page 1892 2020, 10 (10), 1892. <https://doi.org/10.3390/ANI10101892>.
19. Lazarus, B.; Paterson, D. L.; Mollinger, J. L.; Rogers, B. A. Do Human Extraintestinal *Escherichia Coli* Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate from Food-Producing Animals? A Systematic Review. *Clin. Infect. Dis.* 2015, 60 (3), 439–452. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu785>.
20. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, Forrest A, Bullitta JB, Tsuji BT. Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy* 2010, 30 (12), 1279–1291. <https://doi.org/10.1592/PHCO.30.12.1279>.
21. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, X, Chen L, Lv D, He H, Zhou Z, Liang JH, Liu J, Shen. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism *MCR-1* in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet. Infect. Dis.* 2016, 16 (2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

22. Niero G, Bortolaia V, Vanni M, Intorre L, Guardabassi L, Piccirillo A. High Diversity of Genes and Plasmids Encoding Resistance to Third-Generation Cephalosporins and Quinolones in Clinical *Escherichia Coli* from Commercial Poultry Flocks in Italy. *Vet. Microbiol.* 2018, *216*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2018.02.012>.
23. Pesciaroli M, Magistrali CF, Filippini G, Epifanio EM, Lovito C, Marchi L, Marresca C, Massacci FR, Orsini S, Scoccia E, Tofani S, Pezzotti G. Antibiotic-Resistant Commensal *Escherichia Coli* Are Less Frequently Isolated from Poultry Raised Using Non-Conventional Management Systems than from Conventional Broiler. *Int. J. Food Microbiol.* 2020, *314*. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108391>.
24. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017, *30* (2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
25. Portes, A. B.; Rodrigues, G.; Leitão, M. P.; Ferrari, R.; Junior, C. A. C.; Panzenhagen, P. Global Distribution of Plasmid-Mediated Colistin Resistance *Mcr* Gene in *Salmonella*: A Systematic Review. *J. Appl. Microbiol.* 2021, *00*, 1. <https://doi.org/10.1111/JAM.15282>.
26. Proietti, P. C.; Stefanetti, V.; Musa, L.; Zicavo, A.; Dionisi, A. M.; Bellucci, S.; Mensa, A. La; Menchetti, L.; Branciarì, R.; Ortenzi, R.; Franciosini, M. P. Genetic Profiles and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella Infantis* Strains Isolated in Italy in the Food Chain of Broiler Meat Production. *Antibiotics* 2020, *9* (11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110814>.
27. Rhouma, M.; Beaudry, F.; Thériault, W.; Letellier, A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front. Microbiol.* 2016, *0* (NOV), 1789. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01789>.
28. Ricci V, Zhang D, Teale C, Piddock LJV. The O-Antigen Epitope Governs Susceptibility to Colistin in *Salmonella Enterica*. *MBio* 2020, *11* (1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02831-19>.
29. Tate, H.; Folster, J. P.; Hsu, C. H.; Chen, J.; Hoffmann, M.; Li, C.; Morales, C.; Tyson, G. H.; Mukherjee, S.; Brown, A. C.; Green, A.; Wilson, W.; Dessai, U.; Abbott, J.; Joseph, L.; Haro, J.; Ayers, S.; McDermott, P. F.; Zhaoa, S. Comparative Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase CTX-M-65-Producing *Salmonella Enterica* Serovar *Infantis* Isolates from Humans, Food Animals, and Retail Chickens in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, *61* (7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>.
30. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA journal. Eur. Food Saf. Auth.* 2019, *17* (12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5926>.
31. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017. *EFSA J.* 2019, *17* (2). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5598>.
32. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2014. *EFSA J.* 2015, *13* (12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4329>.
33. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-3* in *Escherichia Coli*. *MBio* 2017, *8* (3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00543-17>.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI RIASSORTANTI DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV) CIRCOLANTI IN ITALIA

Legnardi M.¹, Tonellato F. R.², Cioffi A.², Tucciarone C.M.¹, Franzo G.¹, Garavini G.³, Trevisani G.³, Dall'Angelo A.³, Cecchinato M.¹

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

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

³ *Veterinario aziendale*

Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is an immunosuppressive pathogen bearing a considerable impact on the global poultry industry. Despite the amount of literature on IBDV, its traditional classification system, which recognizes classical, variant and very virulent strains, is being questioned for lacking standardization and for not capturing the increasing heterogeneity of the virus. Recently, two phylogeny-based classification methods have been proposed to solve these issues. One is based on the VP2 sequence, and the other on both VP1 and VP2, thus allowing to detect reassortant strains.

This work reports the detection, during routine monitoring activities conducted in Italy, of a cluster of field strains in both broiler and layer farms adopting a range of different vaccination protocols. According to the two classifications, the strains are featured by a very virulent-like VP2. Their VP1, on the other hand, has classical-like features. Based on both genome segments, they group with strains detected within the last decade primarily in Russia and the Middle East, and may be classified as reassortants.

Despite the sampling not being fully representative, it seems that reassortant strains may be extensively circulating on Italian soil. Their actual impact is still unknown, although their features might suggest a reduced pathogenicity compared to proper very virulent strains. These results highlight the importance of a steady and attentive IBDV monitoring by considering both genome segments, and may encourage further works to better characterize the detected strains and the protection conferred against them by commonly adopted vaccination protocols.

INTRODUZIONE

Il virus della bursite infettiva (IBDV) è senza dubbio uno dei patogeni aviari più impattanti a livello sanitario ed economico su scala globale. IBDV appartiene al genere *Avibirnavirus* della famiglia *Birnaviridae*, ed è caratterizzato da un genoma a doppio filamento di RNA composto da due segmenti, denominati A e B. Ne sono riconosciuti due sierotipi, chiamati 1 e 2, ma solo il primo è patogeno. IBDV causa una sintomatologia immunosoppressiva, diretta conseguenza del suo tropismo per i linfociti B immaturi localizzati principalmente nella borsa di Fabrizio (Alkie & Rautenschlein, 2016). Nei polli, l'unico ospite suscettibile alla malattia, il periodo di massima suscettibilità va dalle 2 alle 6 settimane, in cui la borsa di Fabrizio è al suo massimo stadio di sviluppo (Ingrao et al., 2013). La manifestazione clinica include sintomi aspecifici come depressione, disidratazione, anoressia e diarrea, con una mortalità estremamente variabile in base al ceppo coinvolto (Mahgoub, 2012). Le lesioni più frequenti comprendono emorragie a livello di muscoli della coscia e pettorali, un aumento

del contenuto mucoso intestinale ed emorragie della mucosa della borsa di Fabrizio, la quale dapprima aumenta di volume per poi andare incontro ad atrofia. L'immunosoppressione predispone inoltre a infezioni secondarie e può compromettere l'efficacia della vaccinazione nei confronti di altri patogeni (Etteradossi & Saif, 2021).

Nonostante il grande interesse da parte della comunità scientifica, che fa di IBDV il quarto patogeno maggiormente studiato in ambito avicolo (Bertran et al., 2020), la classificazione di questo virus risente tuttora di una mancanza di standardizzazione e sistematicità. La tradizionale categorizzazione in ceppi classici, varianti e *very virulent*, è basata infatti su differenze sia in termini di virulenza che di antigenicità, richiedendo l'esecuzione di diversi test, a loro volta scarsamente standardizzati, per un'adeguata caratterizzazione (Jackwood et al., 2018). Un ulteriore punto a sfavore è la difficoltà nel caratterizzare adeguatamente una vasta gamma di ceppi atipici e dalla diffusione geografica spesso circoscritta, il cui ritrovamento è sempre più frequente. La diffusione delle metodiche molecolari, che ormai rappresentano i test più utilizzati a livello diagnostico, offre al contempo nuove opportunità e nuove sfide. Se è vero che esse non permettono una valutazione diretta né della patogenicità né dell'antigenicità, le potenzialità in termini di standardizzazione fanno di esse la piattaforma ideale per una classificazione robusta, informativa e dalla facile condivisione.

Un primo tentativo in tal senso è rappresentato dalla classificazione filogenetica recentemente proposta da Michel & Jackwood (2017), basata su una porzione ipervariabile del gene della proteina virale 2 (hvVP2), di gran lunga la porzione meglio caratterizzata del genoma di IBDV per via della sua centralità nella determinazione della patogenicità (Brandt et al., 2001). Questa classificazione individua sette diversi genogruppi all'interno del sierotipo 1. I genogruppi G1, G2 e G3, includono rispettivamente i ceppi classici, varianti e *very virulent*, mentre quelli da G4 a G7 raggruppano altrettante varianti atipiche, offrendo quindi una caratterizzazione più precisa dell'eterogeneità di IBDV. Il principale difetto di questa classificazione è che, basandosi solo sulla VP2, sita nel segmento A del genoma, essa non permette di individuare i fenomeni di riassortimento tra diversi segmenti, che gioca un ruolo importante nell'evoluzione genetica di IBDV (Jackwood, 2012; Wu et al., 2020). Una seconda classificazione, proposta da Islam et al. (2021), risolve questo problema prendendo in considerazione non solo la VP2, ma anche la VP1, localizzata sul segmento B del genoma. Vengono così individuati nove genogruppi basati sulla VP2 (A1-A9, largamente corrispondenti con quelli individuati dalla precedente classificazione) e cinque basati sulla VP1. I genotipi così individuati sono finora quindici, corrispondenti ad altrettante combinazioni tra i due segmenti (A1B1, A1B2, ecc.).

Questo lavoro riporta l'identificazione, durante le attività diagnostiche routinarie, di ceppi di campo sinora non riportati in Italia. A seguito del loro ritrovamento, ulteriori indagini sono state svolte per una più precisa caratterizzazione a livello molecolare.

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'indagine è stata svolta su campioni prelevati in allevamenti italiani tra febbraio e agosto 2021 per finalità di monitoraggio, e analizzati all'interno dell'attività diagnostica del laboratorio di Biotecnologie e Malattie Infettive del dipartimento MAPS dell'Università degli Studi di Padova. Gli allevamenti appartenevano a diverse ditte e categorie produttive (ovaiole e *broiler*). I gruppi considerati differivano inoltre in

termini di protocollo vaccinale applicato e di età al campionamento. I campioni sono stati prelevati individualmente, selezionando dieci animali per gruppo, o in *pool*, e consistevano in borse di Fabrizio oppure in tamponi cloacali.

Analisi molecolare

Dopo l'eluizione dei campioni in PBS, gli acidi nucleici sono stati estratti con il kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, Basilea, Svizzera). Gli estratti sono stati quindi sottoposti a RT-PCR *one-step* con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), utilizzando i *primer* 743-1 (5'-GCCCAGAGTCTACACCAT-3') e 743-2 (5'-CCCGGATTATGTCTTTGA-3') disegnati da Jackwood & Sommer-Wagner (2005) per amplificare una porzione della VP2. I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger e la classificazione preliminare è avvenuta tramite comparazione delle sequenze ottenute ad un database di ceppi di referenza.

Ai fini di una più precisa caratterizzazione, una porzione di VP1 dei ceppi di campo ritrovati è stata amplificata utilizzando i *primer* B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTATGAGACCGA-3') e B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') pubblicati da Islam et al. (2012).

Classificazione filogenetica

La classificazione dei ceppi di campo secondo Michel & Jackwood (2017) ha previsto la preparazione di un dataset composto dai ceppi di referenza individuati nell'articolo originale e da Jackwood et al. (2018), rispettivamente per i livelli di genogruppo e di *lineage*. Per la classificazione secondo Islam et al. (2021) sono stati invece preparati due differenti dataset, uno per VP2 e l'altro per VP1, includendo un numero limitato di sequenze a rappresentanza di ciascun genogruppo sulla base delle indicazioni dell'articolo originale.

Dopo aver incluso le sequenze italiane, i rispettivi dataset sono stati allineati con il metodo MUSCLE (Edgar, 2004). Gli alberi filogenetici sono stati quindi ottenuti con il metodo di *Maximum Likelihood* (metodo di sostituzione Tamura-Nei, 1000 *bootstrap*). L'intero processo ha visto l'impiego del software MEGA X (Kumar et al., 2018).

RISULTATI

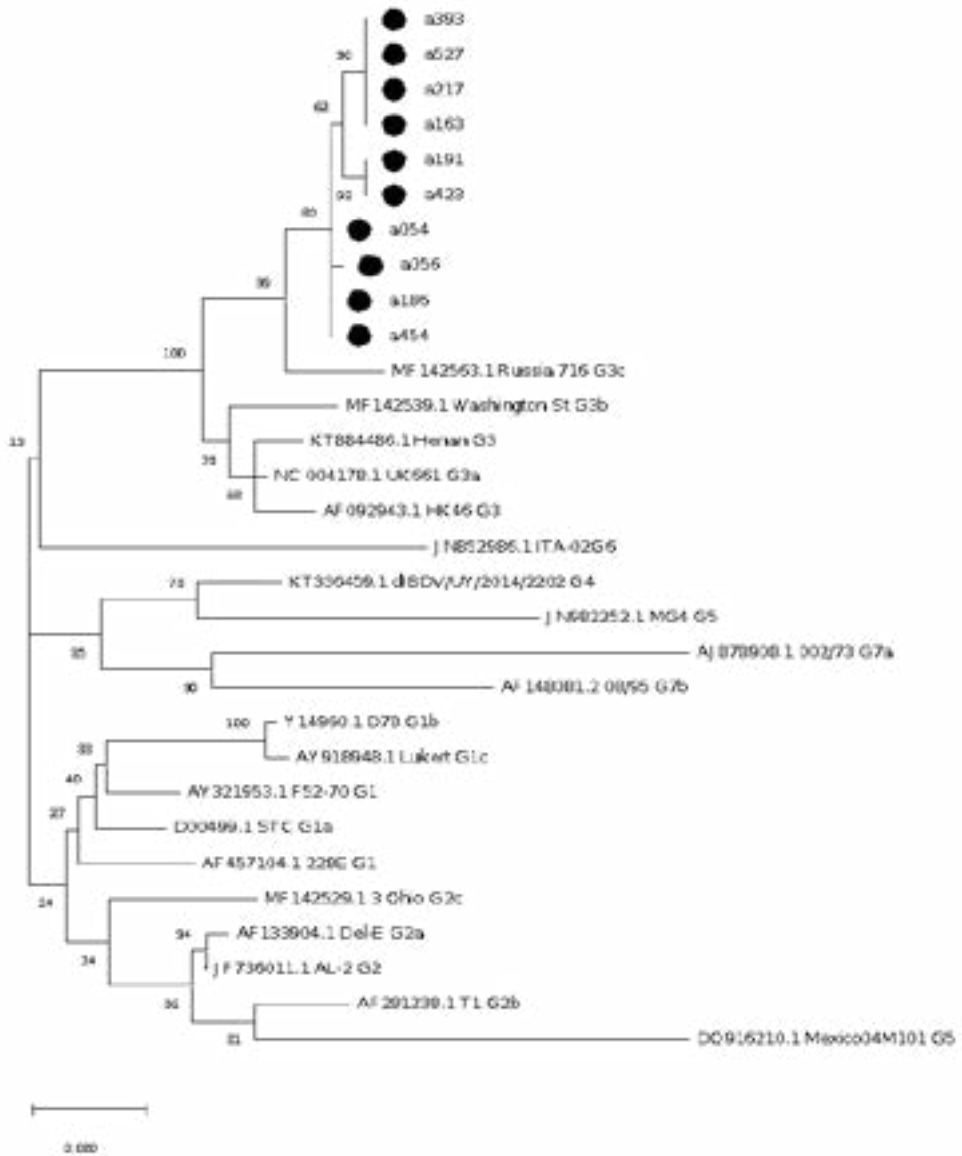
Campionamento e risultati delle analisi molecolari

Lo studio ha coinvolto un totale di 29 gruppi. Per quindici volte le indagini molecolari hanno evidenziato la presenza di ceppi vaccinali, sempre coincidenti con il vaccino effettivamente somministrato. Altri quattro gruppi sono risultati totalmente negativi. Infine, dieci diversi ceppi sono stati identificati preliminarmente come *very virulent*, e ulteriori analisi sono state quindi condotte a livello di VP1. In nessun gruppo è stata attestata la contemporanea presenza di più di un ceppo.

Classificazione filogenetica

La classificazione secondo Michel & Jackwood (2018), basata su un dataset che includeva 30 sequenze, ha evidenziato l'appartenenza dei ceppi di campo presi in esame al genogruppo G3, che raggruppa i ceppi *very virulent* (Figura 1). Sulla base delle 480 posizioni nucleotidiche considerate a livello di hvVP2, i ceppi italiani sono caratterizzati da un'identità media del 99,4%.

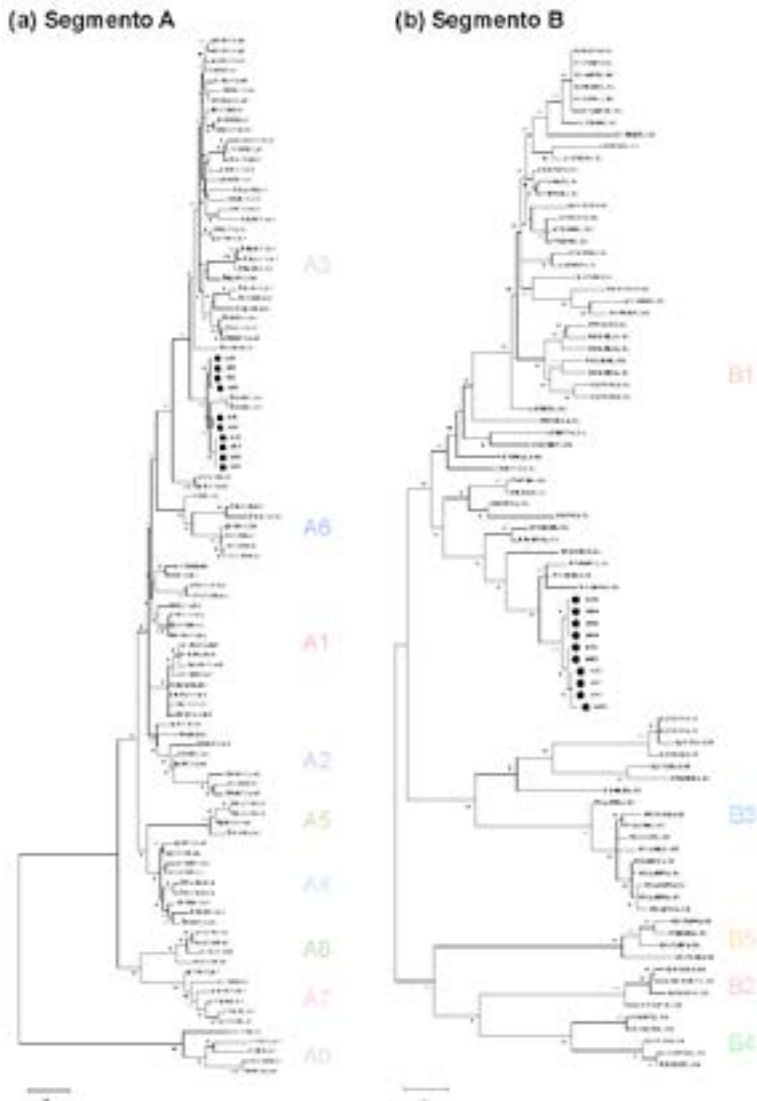
Figura 1. Albero filogenetico che riporta la classificazione secondo Michel & Jackwood (2017) basata sulla sequenza della hvVP2. Le sequenze dei ceppi di campo italiani sono evidenziate con il simbolo ●.



Per quanto riguarda la classificazione secondo Islam et al. (2021), il database VP2 comprendeva 105 sequenze e 338 posizioni nucleotidiche site nella hvVP2, mentre quello VP1 considerava 92 sequenze e 444 posizioni, di fatto corrispondenti alla regione *marker* B individuata da Alfonso-Morales et al. (2015). Questa seconda classifica-

zione ha prodotto esiti analoghi a livello di VP2 (Figura 2a), secondo cui le sequenze in esame ricadono nel genotipo A3 (*very virulent*). È stata inoltre evidenziata la presenza di ulteriori ceppi *very virulent* all'interno del *cluster* di sequenze italiane. Basandosi sulla VP1, i ceppi italiani ricadono invece nel genogruppo B1 (*classical-like*) (Figura 2b). Prendendo in considerazione entrambi i segmenti, i ceppi sono quindi classificati nel genotipo A3B1.

Figura 2. Alberi filogenetici costruiti secondo la classificazione proposta da Islam et al. (2021) a livello di VP2 (a) e VP1 (b). Le sequenze dei ceppi italiani sono evidenziate con il simbolo ●.



DISCUSSIONE

Le analisi molecolari hanno permesso di evidenziare la presenza sia di ceppi vaccinali che di campo. L'identificazione del ceppo vaccinale somministrato è di per sé auspicabile, in quanto il meccanismo di azione dei vaccini ad immunocomplessi e dei vivi attenuati è basato sulla colonizzazione della borsa di Fabrizio da parte dei ceppi di IBDV su cui sono basati e sulla loro attiva replicazione nell'organo. Il funzionamento dei vaccini ricombinanti non dipende invece dalla colonizzazione della borsa di Fabrizio, ma, essendo questi vaccini basati su herpesvirus ingegnerizzati (r-HVT) per esprimere sulla loro superficie la VP2 di IBDV, che può quindi essere identificata tramite RT-PCR in diversi tessuti, occasionalmente anche a livello di borsa (Ingrao et al.2017).

D'altro canto, la circolazione di ceppi di campo può rappresentare una minaccia dal punto di vista epidemiologico. In base alle due classificazioni filogenetiche prese in considerazione, non c'è dubbio che i ceppi identificati si caratterizzino come *very virulent* sulla base della sequenza della VP2. Di più difficile interpretazione è la classificazione a livello di VP1, che li fa ricadere all'interno del genogruppo B1. Questo genogruppo include una gran varietà di ceppi, che a livello di VP2 sono categorizzati come A1 (classici), A2 (varianti), A3 (*very virulent*), A4 (*distinct* IBDV), A6 (ITA) e persino A0 (Sierotipo 2).

I ceppi di campo ritrovati potrebbero non rappresentare una novità nel panorama epidemiologico italiano. Recenti studi epidemiologici hanno riportato la circolazione di ceppi con caratteristiche compatibili con gli stipiti qui descritti, per quanto l'assenza di sequenze disponibili pubblicamente prevenga un confronto diretto (Lupini et al., 2016; Gambi et al., 2020). Tuttavia, essendo questi lavori basati sul sequenziamento della sola VP2, i ceppi venivano classificati come *very virulent*. Prendendo in considerazione entrambi i segmenti del genoma, si scopre invece che le sequenze con la maggior percentuale di identità ritrovabili in database pubblici sono state identificate tra il 2014 e il 2016 principalmente in Russia e Medio Oriente (Jackwood et al., 2018) (Tabella 1).

Le uniche informazioni disponibili sui ceppi russi e mediorientali sono relative alla loro caratterizzazione molecolare (Michel & Jackwood, 2017). A livello di VP2, essi hanno caratteristiche tipiche dei ceppi *very virulent*. Per quanto riguarda la VP1 invece, è stato evidenziato come essi formino un *cluster* ben delimitato all'interno del genogruppo G1 (Islam et al., 2021). Analogamente, i ceppi italiani possono essere classificati come riassortanti. Ciononostante, la differenza sostanziale con altri ceppi riassortanti recentemente identificati in Europa settentrionale e occidentale (Mató et al., 2020), è che per questi ultimi l'origine della VP1 è facilmente riconducibile a ceppi classici attenuati, mentre lo stesso non sembra valere per gli stipiti italiani. Una possibile spiegazione può essere trovata nel tempo trascorso dall'evento di riassortimento, che attraverso una successiva evoluzione può aver portato all'acquisizione di caratteristiche peculiari all'interno del genogruppo G1.

Tabella 1. Sequenze caratterizzate dalla maggiore affinità (identità maggiore o uguale di 97,5%) con i ceppi di campo italiani a livello di VP1 e VP2, identificati attraverso l'algoritmo BLAST. Il ceppo utilizzato per l'analisi è stato a054, considerando un segmento di 480 posizioni nucleotidiche per la VP2 e 444 per la VP1.

VP1			VP2		
ID ceppo	Numero d'accesso GenBank	Percentuale d'identità	ID ceppo	Numero d'accesso GenBank	Percentuale di identità
224_Russia	MF142464	98,65%	710_Jordan	MF142560	98,12%
189_Russia	MF142463	98,65%	276_Jordan	MF142517	98,12%
716_Russia	MF142488	98,62%	774_Kazakistan	MF142578	97,92%
717_Russia	MF142489	98,59%	590_Russia	MF142549	97,71%
774_Kazakistan	MF142497	97,52%	437_Russia	MF142537	97,71%
			232_Russia	MF142515	97,71%
			189_Russia	MF142509	97,71%
			716_Russia	MF142563	97,50%

Pur non basandosi su un campionamento realmente rappresentativo, i risultati ottenuti suggeriscono che i ceppi di campo ritrovati stiano circolando diffusamente sul territorio italiano. Il loro reale impatto epidemiologico sembra essere limitato, in quanto in nessuno degli allevamenti campionati è stata riscontrata una sintomatologia conclamata. Ciò potrebbe essere dovuto ad una limitata patogenicità di questi ceppi, compatibile con la loro natura di riassortanti, o ad una buona efficacia dei protocolli vaccinali adottati. A tal proposito, è necessario sottolineare che i ceppi di campo sono stati identificati almeno una volta in gruppi vaccinati con tutte le tipologie di vaccino considerate. Il loro rinvenimento non sembra quindi essere associato alla scarsa efficacia di un particolare vaccino.

Un altro dato interessante è l'assenza di co-circolazioni, in particolare tra ceppi vaccinali e di campo, all'interno dello stesso gruppo. Seppur possibili, esse sembrano avvenire raramente, al contrario di ciò che succede per altri virus aviari. Questa informazione può risultare utile per una corretta pianificazione delle attività diagnostiche, e per una corretta interpretazione delle stesse.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare la presenza di ceppi riassortanti sul territorio italiano. Il fatto che, limitandosi a considerare la sequenza della VP2, essi vengano classificati come *very virulent*, evidenzia l'importanza di considerare entrambi i segmenti del genoma di IBDV per una classificazione davvero esaustiva. L'impatto sanitario di questi ceppi sembra essere limitato ma, anche alla luce della loro circolazione in diverse filiere e tipologie produttive, ulteriori studi sono necessari per una precisa valutazione della loro patogenicità e della protezione offerta contro di essi da parte dei vari protocolli vaccinali.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfonso-Morales A, Rios L, Martinez-Perez O, Dolz R, Valle R, Perera CL, Bertran K, Frías MT, Ganges L, Díaz de Arce H, Majó N, Núñez JI and LJ Pérez. (2015). Evaluation of a phylogenetic marker based on genomic segment B of infectious bursal disease virus: facilitating a feasible incorporation of this segment to the molecular epidemiology studies for this viral agent. *PLoS One*, 10: e0125853.
2. Alkie TN and S Rautenschlein. (2016). Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, 19: 9-18.
3. Bertran K, Cortey M and I Díaz. (2020). The use of H-index to assess research priorities in poultry diseases. *Poultry science*, 99(12): 6503-6512.
4. Block H, Meyer-Block K, Rebeski DE, Scharr H, de Wit S, Rohn K and S Rautenschlein. (2007). A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathology*, 36(5): 401-409.
5. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA and VN Vakharia. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 75: 11974-11982.
6. De Herdt P, Ducatelle R, Uyttebroek E, Sneepe A and R Torbeyns. (2000). Significance of Infectious Bursal Disease Serology in an Integrated Quality Control Program under European Epidemiologic Conditions. *Avian Diseases*, 44(3): 611-617.
7. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004). *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
8. Etteradossi N and YM Saif. (2020). Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, Wiley-Blackwell, pp. 257-283.
9. Gambi L, Berto G, Fiorentini L, Koutoulis K, Barbieri I, Massi P and G Tosi. (2020). Studio della circolazione del virus della bursite infettiva negli allevamenti di pollastre della linea ovaiola da consumo nel periodo maggio-settembre 2019. In: *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2020. LIX Convegno Annuale & V Simposio Scientifico*. P. 119
10. Ingrao F, Rauw F, Lambrecht B and T van den Berg. (2013). Infectious bursal disease: a complex host-pathogen interaction. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(3): 429-438.
11. Ingrao F, Rauw F, van den Berg T and B Lambrecht. (2017). Characterization of two recombinant HVT-IBD vaccines by VP2 insert detection and cell-mediated immunity after vaccination of specific pathogen-free chickens. *Avian Pathology*, 46(3): 289-299.
12. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Etteradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathology*, 50: 190-206.
13. Jackwood DJ (2012). Molecular Epidemiologic Evidence of Homologous Recombination in Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases*, 56(3): 574-577.
14. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2005). Molecular Epidemiology of In-

- fectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emerging Viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49: 220-226.
15. Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO and S de Wit. (2018). A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathology*, 47: 576-584.
 16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547–1549.
 17. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M and Catelli E. (2016). A molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathology*, 45(4): 458-464.
 18. Mahgoub HA. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*, 157: 2047–2057.
 19. Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K and V Palya. (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Veterinary Microbiology*, 245: 108663.
 20. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Archives of Virology*, 162: 3661-3670.
 21. Wu T, Wang Y, Li H, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X and X Qi. (2020). Naturally occurring homologous recombination between novel variant infectious bursal disease virus and intermediate vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 245:108700.



EFFICACIA E SICUREZZA DI UN VACCINO VIVO PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: STUDIO DI CAMPO E ASPETTI MOLECOLARI

Lupini C.¹, Catelli E.¹, Giudice C.², Benedetti V.³, Quaglia G.¹, Mescolini G.¹, Tecilla M.², Ortali G.⁴, Prandini F.³, Volorio A.³

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

² *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via dell'Università 6, Lodi (MI)*

³ *Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Via Lorenzini 8, Milano*

⁴ *Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi 5, San Michele Extra (VR)*

Summary

To improve Turkey Haemorrhagic Enteritis virus (THEV) control in turkey production, live attenuated vaccination has been temporarily introduced in Italy. To monitor vaccine take and field virus circulation, a combined PCR and sequencing protocol for vaccine or field strain differentiation was applied in four meat turkey flocks. Birds were THEV-vaccinated at four weeks of age with live vaccine (2 flocks) or not vaccinated (2 flocks), then from day 1 to day 63 of life, five turkeys per group were selected and scored *in vivo* and *at post-mortem*, to assess clinical sign and macroscopic lesions in spleen and duodenum referable to THEV infection; the same birds were sampled by cloacal swabs and spleen collection weekly up to the end of the production cycle for THEV PCR detection and differentiation of field and vaccine strains. Strains of vaccine origin were mainly detected from 4 weeks of age in live-vaccinated flocks up to the end of the production cycle, while field strains were always detected from 5 weeks of age in unvaccinated groups. The cumulative clinical and macroscopic scores were lower in vaccinated animals than in unvaccinated ones. Results showed that persistence of the vaccine strain in live-vaccinated flocks is able to reduce field virus circulation.

INTRODUZIONE

L'enterite emorragica (HE) del tacchino è una malattia virale che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita. L'importanza economica di questa malattia è dovuta alla mortalità da essa provocata, che può raggiungere anche il 60%, ed alla presenza di una immunodepressione transitoria che può favorire l'insorgenza di altre patologie (Saunders et al., 1993). Negli ultimi la malattia si è manifestata in forma subclinica, determinando mortalità solo a seguito di infezioni batteriche secondarie (Giovanardi et al., 2014). L'agente eziologico dell'enterite emorragica è *Turkey siadenovirus A* (genere *Siadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*) virus a DNA lineare a doppio filamento, comunemente denominato Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus (THEV). Dal 2018 per il controllo dell'Enterite Emorragica del tacchino è stato introdotto in alcune regioni del nostro Paese, con permesso di importazione temporaneo, un vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth. Il presente lavoro è nato con l'obiettivo di valutare efficacia e sicurezza in campo del suddetto vaccino vivo in gruppi di tacchini vaccinati e non per THEV, mediante score clinico ed anatomo-patologico, rilevazione molecolare del vaccino o del ceppo campo in tamponi cloacali e milze, in corso di studi longitudinali.

MATERIALI E METODI

Piano sperimentale

Sono stati inclusi nello studio 4 gruppi di tacchini da carne, 2 di femmine (gruppi 1 e 3) e 3 di maschi (gruppi 2 e 4). I gruppi 1 e 2 sono stati oggetto di profilassi vaccinale per Enterite Emorragica a 28 giorni di vita mediante somministrazione in acqua da bere del vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth; i gruppi 3 e 4 non sono stati vaccinati. Settimanalmente, dal primo al 63° giorno di vita, 5 soggetti per gruppo sono stati selezionati, soppressi e sottoposti ad indagine necroscopica, ad ognuno è stato attribuito uno score clinico ed anatomo-patologico (Tabella 1). A partire dalle 3 settimane di vita sino a fine ciclo produttivo, dagli animali sono stati raccolti tamponi cloacali e milze per la ricerca e la caratterizzazione di THEV mediante PCR e sequenziamento.

Tabella 1. Score clinico ed anatomo-patologico.

Sintomi clinici e lesioni anatomo- patologiche	SCORE		
	0	1	2
Condizioni generali	Buone	Depressione, penne arruffate	Diarrea emorragica, morte
Aspetto macroscopico della Milza	Assenza di lesioni	Aumento di volume	Aspetto marmorizzato
Aspetto macroscopico del Duodeno	Assenza di lesioni	Distensione e congestione della parete	Contenuto emorragico nel lume

Estrazione del DNA virale

I tamponi cloacali sono stati processati in pool o singolarmente. Per l'estrazione in pool i tamponi di ogni campionamento sono stati risospesi in 1 ml di PBS sterile mentre per l'estrazione in singolo ogni tampone è stato risospeso in 0.5 ml di PBS. La processazione delle milze è avvenuta singolarmente, prelevando 25 mg per milza. Il DNA virale è stato estratto utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) seguendo il protocollo del produttore.

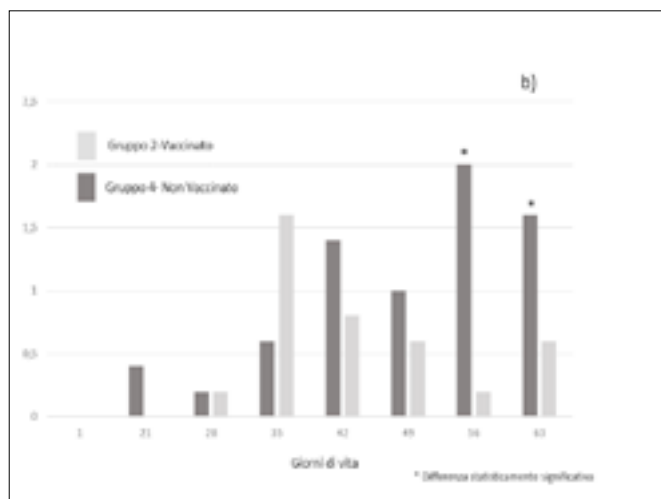
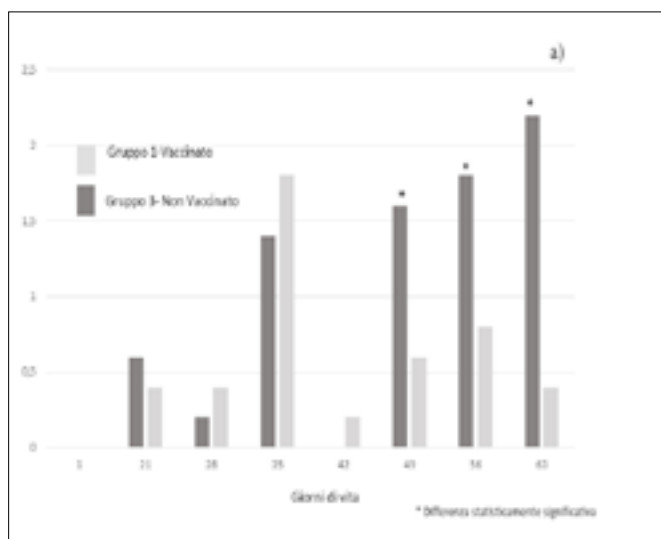
PCR per THEV, sequenziamento ed analisi di sequenza

Per la ricerca e la differenziazione dei ceppi di campo dai ceppi vaccinali di THEV, è stato utilizzato un protocollo che prevede l'amplificazione ed il sequenziamento di una porzione del genoma virale, sede di marker vaccinali (Lupini et al., 2018). Brevemente, i campioni sono stati sottoposti ad una PCR che prevede l'amplificazione della regione 3' del gene ORF1 (primer forward 5'-CAGGGTAGCGCTT-TGTC-3'; primer reverse 5'-ACATGCGTTTTTGTTCCTTT-3'). Gli amplificati sono stati purificati utilizzando l'enzima ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (ThermoFisher Scientific) seguendo il protocollo del produttore e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Madrid, Spain). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate mediante il software Bioedit, allineate e confrontate con sequenze di ceppi THEV precedentemente ottenute, del vaccino o con sequenze omologhe presenti nel database GenBank.

RISULTATI

Il punteggio cumulativo dello score clinico ed anatomo-patologico per gruppo è riportato in figura 1. I gruppi non vaccinati (2 e 4) hanno mostrato un punteggio complessivo significativamente più alto ($p < 0.05$) rispetto ai gruppi vaccinati (gruppi 1 e 3) ai giorni di vita 49 (solo gruppo 3), 56 e 63. A 7 giorni post-vaccinazione invece, è stato osservato un punteggio cumulativo maggiore (anche se non statisticamente significativo) nei gruppi vaccinati rispetto ai gruppi non vaccinati, attribuibile nello specifico ad un aumento di volume della milza.

Figura 1. Punteggi cumulativi dello *score* clinico ed anatomopatologico nei gruppi 1 e 3 (a) e 2 e 4 (b).



I risultati degli studi longitudinali sono riportati nella tabella 2. Nei gruppi 1 e 3, vaccinati con vaccino vivo attenuato, sono stati rilevati persistentemente ceppi di origine vaccinale (da 5 a 18 settimane di vita). All'analisi di sequenza tutti i ceppi evidenziati mostravano infatti 100% di identità nucleotidica con il ceppo vaccinale Domermuth nella regione 3' del gene ORF1. In questi gruppi la presenza di ceppi di campo è stata rilevata solo sporadicamente.

Tabella 2. Risultati degli studi longitudinali.

Giorno	GRUPPO 1					GRUPPO 3					GRUPPO 2					GRUPPO 4				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-					-					-					-				
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-					-					-					-				
35	-	C	-	-	-	V	V	V	V	V	-	-	-	-	-	V	-	V	-	V
	-	C	-	-	-	V	V	-	V	V	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V
42	-	-	-	-	-	V	V	-	V	V	C	-	C	-	-	V	V	V	V	V
	-	-	-	-	-	V	V	-	V	-	C	-	-	-	-	V	V	-	V	V
49	C	C	C	C	C	V	V	V	V	V	C	C	C	C	C	V	V	C	C	V
	C					V					C					V				
56	C	C	C	C	C	V	V	V	V	C	C	C	C	C	C	C	V	V	V	V
	C					V					C					C				
63	C	C	C	C	C	V	V	V	V	C	C	C	C	C	C	V	C	V	V	V
	C					V							C					V		
77	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C	C	C	C	C	V	V	V	V	V	C	C	C	C	C	V	V	V	V	V
91	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C					V							C					V		
104	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	C	C	C	C	C	V	V	C	V	V	C	C	C	C	C	-	C	C	V	-
118	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	C	C	C	-	V	V	C	V	V
130	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

M = milza
T = tampone cloacale
- = negativo THEV
C = THEV campo
V = THEV vaccino
/ = campionamento non eseguito

Nei gruppi 2 e 4 non vaccinati sono stati rilevati sempre ceppi THEV di campo, a partire dalle 5 settimane di età a fine ciclo. Tutti i ceppi di campo evidenziati durante lo studio hanno mostrato 100% d'identità nucleotidica con ceppi THEV circolanti già nel nostro paese (Lupini et al., 2018).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stata monitorata la circolazione del virus dell'enterite emorragica del tacchino, differenziando i ceppi di campo da quelli vaccinali, in gruppi di animali vaccinati o non. La presenza del ceppo di campo si rileva persistentemente nei gruppi non vaccinati, mentre nei gruppi vaccinati, si rileva il ceppo vaccinale nella maggior parte degli animali fino ad almeno 12 settimane post-vaccinazione. I punteggi cumulativi clinici ed anatomico-patologici, hanno mostrato complessivamente valori inferiori negli animali vaccinati rispetto agli animali non vaccinati, indicando un effetto positivo della vaccinazione particolarmente evidente sulla prevenzione delle lesioni anatomico-patologiche da THEV (dati non riportati).

I risultati ottenuti nel presente lavoro suggeriscono che l'introduzione su larga scala nel nostro paese dell'impiego nella profilassi della Enterite emorragica del tacchino del vaccino vivo attenuato ceppo Domermuth possa favorire una riduzione della pressione infettiva di THEV nell'allevamento del tacchino, limitando la circolazione di questo agente immunosoppressivo virale ed il suo impatto sulla salute degli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G and E Catelli. (2014) Longitudinal field studies of avian metapneumovirus and turkey hemorrhagic enteritis virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. *Veterinary Research Communication*, 38:129–137. 2014.
2. Lupini C, Mescolini G, Alastra G, Silveria F, Felice V and E Catelli (2018) Enterite emorragica del tacchino: caratterizzazione molecolare di ceppi circolanti in Italia. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2018. III Simposio Scientifico, Parma 14 Settembre 2018.* pp. 131-134
3. Saunders GK, Pierson FW, Hurk JV (1993) Haemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: a comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis. *Avian Pathol.*; 22(1):47-58.



LO STRANO CASO DI UN CEPPPO DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* CHE SFUGGE ALLA RIVELAZIONE MEDIANTE PCR *END POINT*

Matucci A.¹, Stefani E.¹, Gavazzi L.², Tondo A.¹, Picchi M.¹, Cristovao Borges L.¹, Bottinelli M.¹, Merenda M.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, via Bovolino 1/C, 37060 Buttapietra (VR);

² Veterinario Aziendale Gruppo Amadori, Via Del Rio n.400, 47522 San Vittore di Cesena (FC)

Summary

Mycoplasma gallisepticum (MG) represents an important pathogen for the poultry industry resulting in large economic losses. MG infects chickens, turkeys and other avian species. The constant use of molecular tests for MG detection and the maintenance of the “MG-free” status of breeder flocks over time are fundamental for the control of this pathogen. Two specific PCRs targeting different portions of the *mgc2* gene of MG are reported in the OIE Terrestrial Manual chapter 3.3.5 (Ver. May 2021): a real-time PCR protocol and an *end point* one. It is reported here the case of a MG strain (IZSVE/9428/VR19) that was detected by the real-time protocol only. As a consequence, an alternative *primer* for the *end point* PCR protocol was developed and tested as well. This MG strain was isolated from tracheal swabs collected from turkeys, and subsequently identified through the 16s rRNA-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) protocol. The *mgc2* nucleotide sequence analysis, carried out employing our alternative *primer*, revealed the presence of a deletion of 30 bases at the *end point* PCR reverse *primer* annealing region. Our finding highlights that the *mgc2* gene, which codifies for a cythadesin, can be subjected to mutations in PCR-specific sites undermining the detection of this pathogen. It follows that “non-typical” strains which go undetected can potentially spread both within and among flocks.

INTRODUZIONE

Mycoplasma gallisepticum (MG) è una delle specie di *Mycoplasma* considerate più impattanti per il settore avicolo, con importanti ripercussioni sia dal punto di vista sanitario che economico. MG è diffuso in tutto il mondo, infettando principalmente le specie pollo e tacchino. Tuttavia, il patogeno è stato rilevato in altre specie avicole, come la quaglia, il fagiano e l’oca. MG è in grado di diffondersi orizzontalmente attraverso contatto diretto tra animali, con aerosol, polveri e penne. Inoltre, MG può essere trasmesso verticalmente nell’uovo [1]. La malattia a cui il patogeno è storicamente associato è la “Chronic Respiratory Disease” (CRD), caratterizzata da un’inflammatione cronica delle vie aeree, in particolare dei sacchi aerei. Tale processo flogistico ha come conseguenza una minor deposizione di uova, una riduzione della conversione della massa ponderale ed un generale aumento dello scarto al macello nelle linee da carne. Solitamente, il tacchino risulta più sensibile a MG rispetto al pollo [2].

A livello industriale, il mantenimento di gruppi di riproduttori “*Mycoplasma-free*”

risulta la strategia migliore per il contenimento di questo patogeno; ciò viene attuato attraverso un'implementazione di elevati livelli di biosicurezza in allevamento e attraverso un continuo monitoraggio della presenza del patogeno con analisi di laboratorio eseguite con cadenza minima quindicinale [3]. Essendo la rapidità dell'esito un requisito importante in questa fase produttiva, la PCR è considerata la metodica di elezione, seppur sia corretto ricordare che l'isolamento *in vitro* rappresenta il *gold standard* per la rilevazione diretta del microrganismo [4]. Il gene target specie-specifico per MG è *mgc2* (codificante per una citoadesina), il quale viene amplificato sia con protocolli *end point* PCR che real-time PCR [4,5]. Questi protocolli sono riportati anche nel manuale degli animali terrestri del World Organisation for Animal Health (OIE) al Cap 3.3.5, recentemente aggiornato. Il gene *mgc2*, inoltre, è un target ottimale per la differenziazione e la genotipizzazione di MG [6–8].

Qui viene presentato un caso di positività per MG in un allevamento di tacchini industriali ove la metodica *end point* in uso presso i nostri laboratori si è rivelata inefficace e quindi considerata “cieca” nell'identificazione del patogeno a causa di mutazioni sul sito di legame del *primer reverse*. L'utilizzo di una PCR alternativa con un nuovo *primer reverse* ha reso possibile identificare la zona della sequenza *mgc2* interessata da mutazione e successivamente rilevare la presenza di MG nei campioni analizzati.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Da un allevamento di tacchini sono stati conferiti presso il Laboratorio Micoplasmi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) 3 campioni di trachee con richiesta diagnosi per sospetto MG ed eventuale tipizzazione del gene *mgc2*. Gli animali presentavano una forma respiratoria lieve che si manifestava con leggera tosse associata a scarsi rantoli. Il responsabile sanitario dell'allevamento riporta che all'esame necroscopico si sono avute scarse evidenze di aerosacculiti fibrinose.

Isolamento da brodocolture

Le trachee conferite sono state campionate, inviate al laboratorio in terreno di trasporto (Avian Mycoplasma Liquid Medium, Mycoplasma Experience®) e coltivate mediante procedura interna basata sul manuale OIE per animali terrestri, con incubazione a 37° C al 5% di CO₂ in terreno liquido PPLO (BD Difco ®) e Avian Mycoplasma Liquid Medium. La coltura è stata controllata giornalmente fino a cambiamento di colore e/o torbidità del brodo.

Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto dalle brodocolture sospette positive con Maxwell DNA LEV Blood DNA Kit in strumentazione Maxwell-16 ® Instrument (Promega) secondo le istruzioni suggerite dalla ditta.

16s rDNA DGGE (gel elettroforesi in gradiente denaturante)

Il DNA estratto dagli isolati di trachea, e dai ceppi NCTC 10115 di *M. gallisepticum* e NCTC 10124 di *M. synoviae* è stato amplificato con *primer* specifici per la regione V3 del gene 16S. Gli amplificati ottenuti sono stati separati in gel di poliaccrilammide

formato da un gradiente lineare di urea dal 60% al 30%, posto in buffer TAE preriscaldato a 60° C. La corsa elettroforetica denaturante ha una durata di circa 17 ore. Il gel è stato poi colorato con SYBR™ Safe DNA stain (ThermoFisher) e rivelato con l'analizzatore di immagini Gel Doc™ XR System (Bio Rad). L'identificazione del campione in esame è stata assegnata in base alla sovrapposizione del profilo elettroforetico con gli standard MG e MS [9].

PCR end point Mycoplasma gallisepticum

Il DNA estratto è stato amplificato utilizzando *primer* specifici (Tab. 1) già descritti [10] per il gene *mgc2* (GenBank accession number U34842, Fig. 1). Il kit di amplificazione impiegato è Fast Start™ Taq DNA polimerasi (Merck) ed è stato utilizzato il termociclatore GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems) impiegando come controllo positivo DNA da ceppo MG 6/85. Il ciclo prevedeva una denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min seguito da 40 cicli a 95 °C per 45 sec, 54 °C per 1 min, e 72 C° per 1 min, estensione finale a 72 °C per 7 min. Per la visualizzazione il prodotto di amplificazione è stato utilizzato un sistema di elettroforesi capillare QIAxcel Advanced System (Qiagen). La dimensione dell'amplificato è di circa 237-303 bp.

PCR real time Mycoplasma gallisepticum

Per la rivelazione di MG in PCR real-time è stata amplificata una zona genica di *mgc2* situata al 5' rispetto al PRR (Fig.1). Sono stati utilizzati *primer* e sonda descritti in letteratura [4] e riportati in Tab. 1. L'amplificazione è stata eseguita con il kit Path ID™ qPCR Master Mix Kit (Life Technologies) impiegando lo strumento CFX96 Detection System (Bio Rad) col seguente protocollo: denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min seguito da 40 cicli a 95 °C per 15 sec, 60 °C per 1 min.

PCR alternativa Mycoplasma gallisepticum (PCR MG600)

Per la PCR alternativa di MG è stata amplificata una regione più ampia del gene *mgc2* similmente a quanto descritto per la PCR *end point* impiegando i *primer* descritti in Tab.1. L'amplificazione è stata eseguita col seguente protocollo: una denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min seguito da 40 cicli a 95 °C per 45 sec, 52 °C per 1 min, e 72 C° per 2 min, estensione finale a 72 °C per 7'. L'amplicone di questa PCR misura circa 600 bp (Fig.1).

Sequenziamento genico e analisi bioinformatica

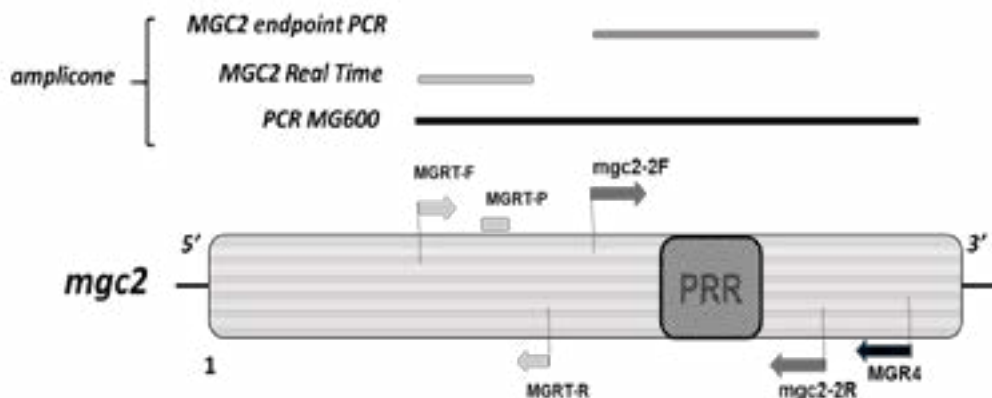
I campioni amplificati sono stati sequenziati su entrambi i filamenti impiegando BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 2.0 (ThermoFisher) su sequenziatore automatico ABI PRISM 3500XL Genetic Analyzer (ThermoFisher). I sequenziamenti sono stati analizzati mediante software BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.6.1 (10) e le sequenze sono state analizzate con BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e programma "Megablast". L'albero Neighbour-Joining (NJ) è stato prodotto sfruttando il tool Blast Tree View [11]. Le sequenze sono state anche comparate usando l'allineamento multiplo attraverso Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con sequenze derivanti da GenBank. La sequenza del campione IZSVE/9428/VR19 è stata depositata in GenBank con *accession number* MZ751779.1.

Tabella 1. sequenza di *primer* e sonde e dimensioni amplificato delle PCR impiegate.

PCR	Primer Fw	Primer Rv	Sonda	amplificato*
MGC2 <i>end point</i>	Mgc2-F- CGCAATTTGGTC- CTAATCCCCAACA	Mgc2-R- TAAACCCACCTC- CAGCTTTATTTC	-	237-303
MGC2 Real Time	MGRT-F- TTGGGTTTAGG- GATTGGGATT	MGRT-R- CCAAGGGATTCA- ACCATC	MGRT-P-** TxR-TGATGATC- CAAGAACGTGAA- GAACACC -BHQ1	
MGC2 MG600	MGRT-F	MGR4- AAGTTCATGCGGT- TGGACC	-	599

*: bp \pm 10% errore derivante da elettroforesi capillare, **: TrX: Texas Red

Figura 1 Rappresentazione schematica della regione del gene *mgc2* amplificata dalle PCR impiegate, PRR è la sequenza codificante una regione proteica ricca di proline (*proline-rich region*).



RISULTATI

Le trachee conferite sono state campionate e sottoposte a procedura di isolamento. Dei tre campioni analizzati, solamente uno ha determinato un viraggio del terreno di coltura, ed è quindi stato successivamente identificato come MG mediante analisi PCR 16S-rDNA e separazione DGGE (fig. 2A). Per determinare il genotipo mediante analisi di sequenza del gene *mgc2* il DNA di tale campione è stato sottoposto a PCR *end point* MG specifica risultato però negativo all'amplificazione (fig. 2B) rendendo dunque impossibile proseguire con l'analisi. Una seconda PCR MG-specifica di tipo real time è stata impiegata per testare il medesimo DNA estratto, evidenziando stavolta un'amplificazione a circa 20 cicli soglia (Ct, Fig. 3C). Quest'ultimo dato è concorde con il risultato dell'identificazione con metodica DGGE ma differisce da quello ottenuto con metodica *end point*. Al fine di capire il motivo del fallimento di quest'ultima metodica PCR e poter sequenziare anche la porzione gene *mgc2* che comprende il PRR (*proline-rich region*) di questo isolato, è stato disegnato un nuovo

primer reverse prossimo al 3' del gene *mgc2*. Tale *primer* è stato disegnato allineando differenti sequenze nucleotidiche di *mgc2* di MG già depositate in GenBank e valutando quale fosse la regione maggiormente conservata ove costruire tale sequenza. Il *primer forward* impiegato in questa PCR alternativa (PCR MG600) è stato mantenuto quello in uso dalla metodica real time (MGRT). Con questa PCR *end point* alternativa si ottiene un amplicone di circa 600 bp (Fig. 2D) che è stato successivamente sottoposto a sequenziamento. La sequenza ottenuta ha evidenziato nella zona di appaiamento col *primer reverse* della metodica *end point* descritta da Garcia et al. (*mgc2*-R) una mancanza di 21 su 25 basi (Fig. 3A) che impedisce l'amplificazione del ceppo in esame. Per evidenziare eventuali similarità con sequenze depositate in database GenBank, la sequenza è stata sottoposta ad analisi Blast ed il risultato è stato riportato come distanza evolutiva nell'albero NJ di Fig. 3B evidenziando la presenza di alcune sequenze molto simili a quella in esame appartenenti a due ceppi MG identificati in Brasile (isolate 2011/UFGM3 GenBank: KJ019174.1, 2011/UFGM2 GenBank: KJ019173.1) e un ceppo MG isolato in Australia (strain Au97019 GenBank: AY556302.1). L'allineamento di queste sequenze evolutivamente più vicine e quelle dei ceppi vaccinali 6/85 e Ts-11, tuttavia evidenzia una mancanza di 30 bp al 3' solo nella sequenza di *mgc2* del ceppo isolato dai tacchini da noi analizzato (Fig. 3C e 3A)

Figura 2 Risultati di amplificazione PCR. A) 16S-rDNA DGGE, B) PCR MGC2 *end point*, C) PCR Real time MGC2, D) PCR MG600.

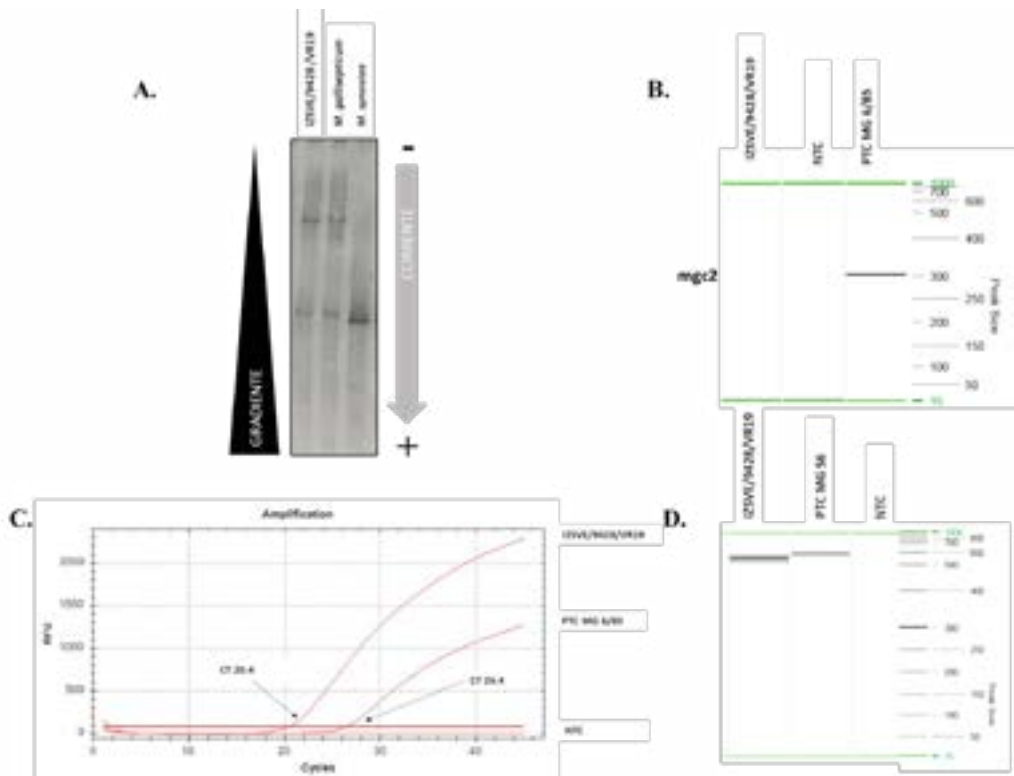
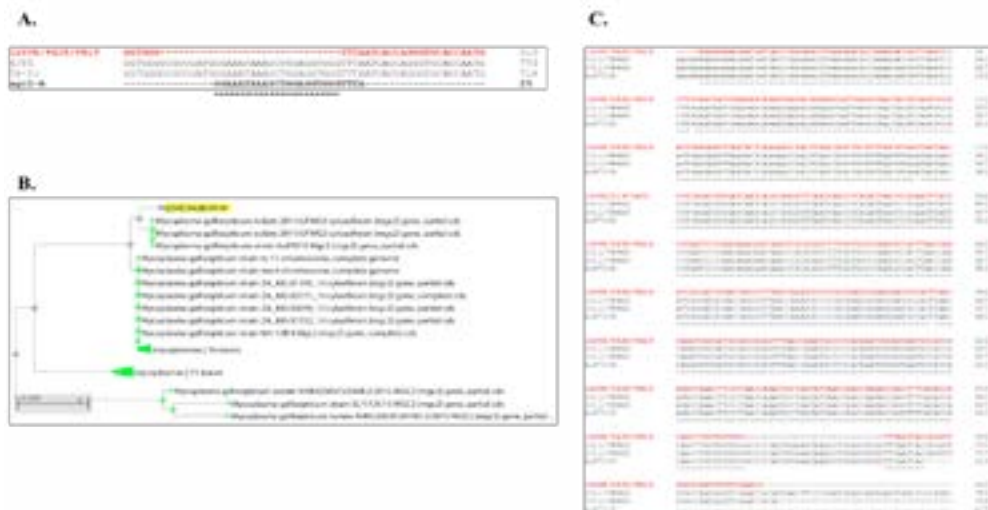


Figura 3 Analisi della sequenza del campione IZSVE/9429/VR19. A) Appaiamento con sequenza complementare inversa del *primer* *mgc2-R*, ceppo vaccinale 6/85 e Ts-11, B) albero Neighbour-Joining, in basso la scala di distanza, C) allineamento Clustal delle sequenze maggiormente simili.



DISCUSSIONE

Le perdite economiche collegate ad infezioni di MG sono ampiamente conosciute [3,12]. Infatti, secondo il nuovo Regolamento EU 2016/429, MG e *M. meleagridis* sono classificati come patogeni lettera D. Inoltre, MG ed *M. synoviae* sono riportati nel manuale degli animali terrestri, in particolare nel capitolo OIE 3.3.5 “Mycoplasmosi aviarie” (<https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>) che definisce gli standard per i test diagnostici al fine di contribuire alla diagnosi, prevenzione ed il controllo di tali malattie in ambito internazionale. Attualmente, la principale strategia di contenimento delle infezioni da micoplasmi (MG incluso) in ambito industriale si basa sul mantenimento di gruppi di riproduttori “*Mycoplasma free*” associato a specifiche e stringenti misure di biosicurezza. Ciò mira ad evitare la trasmissione verticale del patogeno con conseguente diffusione di questo sul territorio. Al tale scopo, è suggerita l’attuazione di un monitoraggio degli animali con cadenza quindicinale utilizzando metodiche diagnostiche rapide e specifiche. Seppur la coltivazione in brodo del patogeno sia il *gold standard* per la diagnosi di micoplasmosi, i test molecolari costituiscono comunque una soluzione efficiente per il monitoraggio degli animali. Il gene *target* di MG, che conferisce specificità e sensibilità a metodi PCR, è quello codificante per la citoadesina *mgc2*. Tale gene ha evidenziato stabilità genetica anche dopo numerosi passaggi *in vitro* [10]; inoltre, sono noti i polimorfismi in lunghezza della sequenza [8] del gene, il quale risulta quindi utile anche per analisi di genotipizzazione [6]. L’impiego nella routine di laboratorio di una PCR MG specifica di tipo *end point* robusta con *primer* già descritti ha permesso sinora di

evidenziare correttamente infezioni di MG e poterne eseguire la genotipizzazione mediante analisi di sequenza della porzione genica codificante la citoadesina. L'analisi PCR real time MG specifica descritta da Raviv et al. [4] amplifica una zona di *mgc2* più corta di quella *end point* che non comprende il PRR, rendendola non adatta per la genotipizzazione di MG. La possibilità di impiegare due metodiche PCR ha permesso di confermare la presenza di MG nei campioni isolati *in vitro*, anche se è stato necessario lo sviluppo di una terza PCR (MG600) per definirne la sequenza e proseguire con la genotipizzazione.

Il ritrovamento di un ceppo di MG con una importante delezione di basi nel sito di legame del *primer* ci insegna che fare affidamento su un solo target molecolare potrebbe non essere sempre una scelta adeguata. Infatti, il nostro lavoro mostra come una PCR considerata negli anni molto solida non ha correttamente identificato un campione positivo per MG. Pertanto, risulta fondamentale per i laboratori diagnostici avere a disposizione vari protocolli di analisi, come l'isolamento e le metodiche molecolari. Inoltre, l'uso di diversi protocolli di amplificazione specifici con target genici peculiari consente di ridurre il margine di errore anche se non è possibile eliminare del tutto l'errore legato all'insorgenza di mutazioni, soprattutto quando si ha a che fare con microrganismi come i micoplasmi, la cui variabilità genetica risulta essere una scelta evolutiva vincente. Lo sviluppo di una nuova PCR *end point* (MG600), da validare su un ampio gruppo di campioni, ha reso possibile identificare correttamente e descrivere il patogeno, che si configura come caso unico ed insolito, almeno nel nostro territorio. È importante evidenziare che, se avessimo avuto a disposizione solamente il protocollo di PCR *end point* per gli *screening* quindicinali dei gruppi di riproduttori, la rilevazione di questo specifico ceppo non sarebbe potuta avvenire. Ne consegue che il ceppo avrebbe potuto diffondersi liberamente fintantoché la sintomatologia clinica non avrebbe destato sospetti tali da richiedere l'impiego di metodiche differenti per raggiungere la diagnosi.

CONCLUSIONI

Sebbene la forma clinica associata ai campioni di tacchini conferiti non fosse caratterizzata dalla presenza di gravi lesioni o sintomi, è stato possibile identificare un nuovo ceppo di *M. gallisepticum* in grado di eludere una metodica di rilevazione PCR riportata nel manuale OIE. Per la corretta diagnosi di questo ceppo è stato necessario adottare un approccio multidisciplinare. Ne è emersa la necessità, in un prossimo futuro, di ripensare ai protocolli di amplificazione basati su questa regione genica e di valutare la messa a punto di PCR multi-target in modo da limitare la possibilità di incorrere in falsi negativi. Come evidenziato in questo lavoro, un corretto approccio diagnostico può evitare la diffusione di patogeni in allevamento con conseguenti perdite economiche e può salvaguardare lo stato sanitario degli animali.

BIBLIOGRAFIA

1. Levisohn, S.; Kleven, S.H. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech.* 2000, 19, 425–442.
2. Ley DH *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Dis. Poult.* 2008, 807–45., doi:10.7150/ijms.8938.

3. Feberwee, A.; De Wit, S.; Dijkman, R. Clinical expression, epidemiology and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update. Clinical expression, epidemiology and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update. 2021, doi:10.1080/03079457.2021.1944605.
4. Raviv, Z.; Kleven, S.H. The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Dis.* 2009, *53*, 103–107, doi:10.1637/8469-091508-Reg.1.
5. García, M.; Ikuta, N.; Levisohn, S.; Kleven, S.H. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* 2005, *49*, 125–132, doi:10.1637/7261-0812204R1.
6. Matucci, A.; Stefani, E.; Gastaldelli, M.; Rossi, I.; De Grandi, G.; Gyuranecz, M.; Catania, S. Molecular differentiation of mycoplasma gallisepticum outbreaks: A last decade study on italian farms using gts and mlst. *Vaccines* 2020, *8*, 1–15, doi:10.3390/vaccines8040665.
7. Rodio, S.; Moronato, M.L.; Sattin, E.; Matucci, A.; Gobbo, F.; Catania, S. *Mycoplasma gallisepticum* nel settore avicolo: studio dei ceppi circolanti negli ultimi tre anni. In Proceedings of the Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria – LIII Convegno Annuale; Salsomaggiore Terme, Italy, 2014; pp. 189–191.
8. Ferguson, N.M.; Hepp, D.; Sun, S.; Ikuta, N.; Levisohn, S.; Kleven, S.H.; García, M. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology* 2005, *151*, 1883–1893, doi:10.1099/mic.0.27642-0.
9. Catania, S.; Gobbo, F.; Ramirez, A.S.; Guadagnini, D.; Baldasso, E.; Moronato, M.L.; Nicholas, R.A.J. Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Vet. Res.* 2016, *12*, doi:10.1186/s12917-016-0680-1.
10. Lysnyansky, I.; García, M.; Levisohn, S. Use of *mgc2*-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Israel. *Avian Dis.* 2005, *49*, 238–245, doi:10.1637/7285-10020R.
11. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, *4*, 406–425, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
12. Ley, David H., H.W.Y.J. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Dis. Poult.* 2008, *12*, 807–834.

LAMP-LFD: MESSA A PUNTO DI NUOVI PROTOCOLLI PER LA RILEVAZIONE RAPIDA, SENSIBILE E SPECIFICA DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK SIEROTIPO 1 E SIEROTIPO 2 E DELL'HERPESVIRUS DEL TACCHINO

Mescolini G.¹, Baigent S.J.², Catelli E.¹, Nair V.K.²

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

² *The Pirbright Institute, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, United Kingdom*

Summary

Serotype-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for Marek's Disease Virus serotype 1 (MDV-1), Marek's Disease Virus serotype 2 (MDV-2), and Herpesvirus of Turkeys (HVT), using previously published LAMP primer sets targeting UL49, UL47, and HVT070 gene respectively, were optimised and adapted for use with a lateral-flow device (LFD) readout by using labelled LAMP primers. A novel LAMP primer set was designed and validated to specifically detect the recombinant HVT vaccine Vaxxitek® in LAMP-LFD tests. The MDV-1, MDV-2, HVT, and Vaxxitek® LAMP-LFD assays specifically and accurately detected their respective target viruses in DNA extracted from field samples where these viruses had previously been detected by real-time PCR. Sensitivity of the MDV-1, MDV-2, HVT, and Vaxxitek® LAMP-LFD assays was the same or 10-fold lower than the sensitivity of routine real-time PCR assay used by MDV OIE Reference Laboratory at The Pirbright Institute, Surrey, United Kingdom. Novel LAMP primers, targeting three single nucleotide polymorphisms in the UL47 gene, were designed and optimised to differentiate field MDV-1 strains from the attenuated CVI988/Rispens vaccine MDV-1 strain (DIVA assays) as MDV-1 UL49 LAMP primers did not differentiate the vaccine from field strains. These UL47 DIVA LAMP assays were highly specific in real-time LAMP, but not very sensitive and the LAMP-LFD version of the assay still needs to be optimised. "Crude" DNA extracted from samples of spleen, liver, ovary, feathers, and poultry house dust using a simple method not requiring laboratory equipment, was successfully used for serotype-specific virus detection in the MDV-1, MDV-2, and HVT LAMP-LFD assays.

INTRODUZIONE

Il virus della malattia di Marek sierotipo 1 (MDV-1 o *Gallid alphaherpesvirus* 2), un herpesvirus appartenente al genere *Mardivirus*, è l'agente eziologico della malattia di Marek (MD), una malattia neoplastica a carattere linfoproliferativo del pollo. Il controllo della MD in campo avicolo è basato sulla vaccinazione con ceppi attenuati di MDV-1, come il ceppo CVI988/Rispens, o con ceppi appartenenti allo stesso genere tassonomico ma a due specie virali diverse quali il *Gallid alphaherpesvirus* 3 o virus della malattia di Marek sierotipo 2 (MDV-2) ed il *Meleagrid alphaherpesvirus* 1 o herpesvirus del tacchino (HVT).

Nessun vaccino ad oggi disponibile per la prevenzione della MD è in grado di impedire l'infezione con ceppi di campo di MDV-1 e la conseguente replicazione ed eliminazione virale: coinfezioni con virus vaccinale e virus di campo sono frequenti negli allevamenti in cui viene applicata la vaccinazione. Di conseguenza è importante poter differenziare i ceppi di campo di MDV-1 dai ceppi vaccinali per potere: (1) confermare il sospetto diagnostico di MD in presenza di sintomatologia clinica o lesioni, (2) monitorare la presenza di ceppi di campo in assenza di sintomatologia clinica o lesioni e (3) confermare il successo vaccinale mediante rilevazione dei virus vaccinali inclusi nel protocollo vaccinale. Mentre la differenziazione fra MDV-1, MDV-2 e HVT risulta semplice per la presenza di geni unici nel genoma di MDV-1 che non trovano omologhi nelle altre due specie virali, la differenziazione tra i ceppi di campo MDV-1 e il ceppo vaccinale CVI988/Rispens risulta essere molto più difficoltosa poiché appartengono alla stessa specie virale e l'organizzazione genomica è totalmente sovrapponibile. Nel corso degli anni sono stati messi a punto svariati test di biologia molecolare (end-point PCR o real-time PCR) per rilevare e differenziare i genomi di MDV-1, MDV-2 e HVT (Handberg et al., 2001; Walkden-Brown et al., 2003; Baigent et al., 2005; Islam et al., 2006; Renz et al., 2006; Cortes et al., 2011). Il numero di metodiche in grado di differenziare i ceppi MDV-1 non vaccinali dai ceppi vaccinali appartenenti alla stessa specie virale (e.g. CVI988/Rispens) è molto più limitato (Gimeno et al. 2014; Baigent et al., 2016, Davidson et al., 2017). Le metodiche di PCR end-point o di real-time PCR sono le più utilizzate per la diagnosi di laboratorio della MD, esse però non sono adatte all'utilizzo in campo in quanto devono essere eseguite da personale formato ed in laboratori attrezzati con apparecchiature dedicate come i termociclatori.

La *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002) è una metodica molecolare rapida, specifica, sensibile e di semplice impiego che può superare i limiti delle metodiche molecolari tradizionali (PCR). La LAMP si avvale di una DNA polimerasi con attività di dislocazione del filamento dell'acido nucleico che permette, in condizioni isotermiche di temperatura ed in combinazione con set di oligonucleotidi appositamente disegnati, l'amplificazione esponenziale della sequenza del DNA target sotto forma di ripetizioni concatenate. Essa non richiede l'impiego di apparecchiature sofisticate ma di bagni o blocchi termostati impostati ad una temperatura costante (60-65°C). La metodica LAMP ha una grande specificità intrinseca derivante dall'impiego di un set di sei primer (FIP, BIP, F3, B3, LF, LB) che si appaiano ad otto regioni genomiche della sequenza nucleotidica scelta come target. Esistono diversi metodi per la visualizzazione dei risultati di una amplificazione LAMP (Becherer et al., 2020). Uno dei più diffusi, per il basso costo, la maneggevolezza e la facilità di lettura e di interpretazione del risultato (visualizzazione di linee colorate), prevede l'utilizzo di strip per test immunocromatografici rapidi o dispositivi a flusso laterale (LFD) (Wong et al., 2018).

Sono state pubblicate in precedenza alcune metodiche LAMP specie-specifiche in grado di identificare il gene *meq* o U_1 49 di MDV-1, il gene U_1 50 di MDV-2 o il gene HVT070 di HVT (Angamuthu et al., 2012; Wei et al., 2012; Woźniakowski et al., 2013; Woźniakowski e Niczyporuk, 2015). Il risultato veniva letto attraverso la visualizzazione di un prodotto fluorescente sotto transilluminatori UV grazie

all'aggiunta di SYBR green all'amplificato LAMP, oppure attraverso la visualizzazione sotto transilluminatori UV della corsa elettroforetica in gel di agarosio del prodotto LAMP, simile a quella di un ladder.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di migliorare le caratteristiche delle metodiche LAMP già esistenti (MDV-1, MDV-2 e HVT) in modo da semplificare la lettura del risultato mediante l'impiego di LFD che velocizzano ulteriormente le tempistiche di analisi e non richiedono l'impiego di termociclatori o transilluminatori. Essendo nota l'elevata tolleranza agli inibitori della metodica LAMP (Francois et al. 2011), le metodiche sopracitate sono state testate su campioni di organi, penne e polveri sottoposti a trattamento termico e centrifugazione, bypassando l'estrazione del DNA genomico con kit commerciali. Sono infine stati messi a punto e validati due nuovi protocolli LAMP con approccio DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) in grado di differenziare fra loro il vaccino HVT ricombinante Vaxxitek® ed il vaccino CVI988/Rispens e di distinguerli dai ceppi di campo MDV-1 non vaccinali.

MATERIALI E METODI

Ceppi virali e campioni diagnostici

Per la messa a punto e l'ottimizzazione dei protocolli LAMP descritti nel presente lavoro sono stati impiegati 15 campioni di DNA virale estratti con il kit commerciale DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) da colture cellulari di fibroblasti embrionali di pollo inoculate con ceppi virali di riferimento di MDV-1, MDV-2 e HVT e da 4 diversi vaccini CVI988/Rispens commercializzati da diverse case farmaceutiche (Tabella 1).

Le metodiche sono state successivamente validate per l'applicazione su diverse matrici testando campioni di DNA estratti da 32 campioni biologici provenienti dal campo e di diversa natura (penne, organi e polvere ambientale) conferiti a fini diagnostici al laboratorio di referenza OIE per la MD (MDVRL) al Pirbright Institute (Woking, Surrey, United Kingdom). I suddetti campioni erano stati precedentemente analizzati con una metodica real-time PCR accreditata del laboratorio di referenza per la rilevazione e la differenziazione di ceppi MDV-1 vaccinali (CVI988/Rispens) e non, MDV-2 o HVT. Spesso lo stesso campione risultava positivo per due o più virus contemporaneamente. Aliquote di 11 dei suddetti campioni diagnostici, selezionate per rappresentatività di matrice, sono state risospese in PBS (4-8% w/v), trattate termicamente (95°C per 10 minuti) e centrifugate (1000 xg per 3 minuti). Il surnatante ottenuto è stato testato in LAMP-LFD senza previa estrazione del DNA con kit del commercio.

Tabella 1 - Isolati virali impiegati in questo studio

Nome del ceppo virale	Specie virale
Fc126	HVT
Vaxxitek®	rHVT ^a
Innovax	rHVT
SB-1	MDV-2
CVI988/Rispens (POULVAC MAREK CVI®, Fort Dodge Animal Health)	attMDV-1 ^b
CVI988/Rispens (RISMAVAC®, Intervet)	attMDV-1
CVI988/Rispens (CRYOMAREX® RISPENS, Merial)	attMDV-1
CVI988/Rispens (Ventri Biologicals)	attMDV-1
HPRS-B14	vMDV-1
JM102/W	vMDV-1
571	vMDV-1
RB-1B	vvMDV-1
549	vvMDV-1
Md5	vvMDV-1
595	vvMDV-1
660A	vv+MDV-1
684A	vv+MDV-1
675A	vv+MDV-1
C12-130	hvMDV-1

^a Vaccino ricombinante a base HVT

^b Patotipo MDV-1: att = attenuato, v = virulent, vv = very virulent, vv+ = very virulent +, hv=hypervirulent

Messa a punto dei protocolli LAMP

I protocolli LAMP descritti nel presente lavoro, sono stati inizialmente valutati per sensibilità e specificità, con primer non marcati, in real-time; solo in seconda battuta le reazioni sono state traslate in LAMP-LFD utilizzando primer marcati.

Per la amplificazione di HVT, MDV-2 e MDV-1, sono stati impiegati tre set di primer già descritti da Wozniakowski et al. (2013) e Wozniakowski & Niczyporuk (2015) (Tabella 2). Per l'amplificazione del vaccino Vaxxitek® HVT+IBD (Boehringer Ingelheim) e l'amplificazione differenziale del ceppo vaccinale CVI988/Rispens e MDV-1 non vaccinali due ulteriori set di primer sono stati disegnati *ex novo* impiegando il software online Primer Explorer V5. Per migliorare la sensibilità delle metodiche le sequenze di alcuni primer sono state modificate manualmente.

Il set di primer specifico per Vaxxitek® HVT+IBD, un vaccino HVT ricombinante che esprime il gene che codifica per la VP2 del virus della bursite infettiva aviaria (IBDV), è stato disegnato per amplificare la sequenza del vettore di clonaggio e del sito di inserzione in HVT (gene HVT065 e regione intergenica) del gene della VP2 di IBDV.

Il secondo set di primer disegnato *ex novo* aveva come target porzione del gene U_L47 di MDV-1, che codifica per una proteina del tegumento (Chuard et al., 2020), e la regione intergenica adiacente. I primer LAMP FIP e BIP sono stati disegnati manualmente, in due versioni, impiegando la metodica MAMA (Mismatch amplification mutation assay)

(Cha et al., 1992). Una versione è stata disegnata per il saggio mirato all'amplificazione del solo ceppo vaccinale CVI988/Rispens e l'altra per il saggio mirato all'amplificazione dei soli MDV-1 non vaccinali includendo due SNPs all'estremità 3' dei primer accoppiati ad un mismatch in penultima posizione, al fine di incrementare la specificità verso il target vaccinale o verso il target non vaccinale. Il primer LB conteneva nella sua sequenza un terzo SNP ed è stato anch'esso disegnato appositamente al fine di incrementare la specificità verso il target vaccinale o verso il target non vaccinale. I primer LF, F3 and B3 erano universali per MDV 1.

Per le reazioni LAMP in real-time è stato impiegato il termociclatore 7500FAST system® (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) e per la lettura ed analisi dei risultati (curve di amplificazione e di melting) il software ABI 7500 v2.3. Le reazioni LAMP avvenivano in piastre da PCR real-time da 96 pozzetti. In ogni pozzetto venivano caricati 3 µl di DNA templatato aggiunti a 22 µl di mastermix (25 µl totali) così costituita: 15 µl di Isothermal Master Mix ISO-004 (Optigene Limited, Horsham, West Sussex, UK), 1 µl di outer primer (F3 + B3 alla concentrazione di 5 µM/primer), 1 µl di inner primer (FIP + BIP alla concentrazione di 50 µM/primer), 1 µl di loop primer (LF + LB alla concentrazione di 25 µM/primer), 4 µl di acqua per biologia molecolare. La mastermix ISO-004 conteneva un colorante intercalante del ds-DNA che viene rilevato impostando nella strumentazione il canale SYBR green/FAM per la lettura della fluorescenza. Il ciclo termico aveva una durata di 30 minuti a 65°C ed era seguito da un'analisi di melting a 98°C per 15 sec, 80°C per 1 minuto, 98°C per 1 min, 98°C per 30 sec e 80°C per 15 sec per confermare la specificità dell'amplificazione nei campioni positivi.

Per la LAMP-LFD è stata utilizzata una mix di reazione analoga a quella utilizzata per la LAMP in real-time sostituendo una coppia di primer non marcati/set con una coppia di primer marcati all'estremità 5' con Biotina (Btn), 6-FAM™ (FAM) o Digossigenina (Dig). La mix di reazione (25 µl totali) contenente 3 µl di DNA templatato veniva caricata in provette singole da 0,5 ml ed incubata per 30 minuti in un bagno termostatico impostato a 65°C. Trascorsi i 30 minuti ai 25 µl di prodotto di reazione LAMP venivano aggiunti 100 µl di buffer fornito dalla casa produttrice dell'LFD (Abingdon Health). La soluzione ottenuta (125 µl) veniva caricata nel LFD per la corsa sulla apposita striscia posizionata all'interno di una custodia di plastica. L'esito della corsa nella striscia del LFD veniva letto dopo dieci minuti di incubazione a temperatura ambiente. Le strip del test immunocromatografico rapido a flusso laterale utilizzate in questo studio possiedono tre linee: linea test 1 (T1), linea test 2 (T2) e linea di controllo (C). In corrispondenza di queste linee sono adsorbiti anticorpi che catturano in modo specifico amplificati marcati FAM-Btn (T1) oppure DIG-Btn (T2) generando bande rosa visibili ad occhio nudo. La comparsa della linea C conferma l'avvenuta corsa della soluzione nella strip dell'LFD e deve apparire dopo ogni corsa perché la reazione sia valida.

Per tutti i protocolli LAMP messi a punto (sai in real-time sia -LFD) sono state valutate sensibilità e specificità. La sensibilità analitica dei protocolli, espressa come limite di rilevazione (LoD), è stata valutata impiegando come templatato il DNA estratto dai cloni virali infettivi HVT, SB-1 (MDV-2), CVI988/Rispens, RB-1B (vvMDV-1), e Vaxxitek® (rHVT) realizzati con la tecnologia dei cromosomi artificiali batterici (BAC) disponibili presso il MDVRL. Quantità note dei suddetti cloni infettivi sono state diluite in base 10 (da 10⁰ a 10⁶ copie in 3 µl) e successivamente testate in triplicato per determinare il LoD di ogni protocollo. Il LoD è definito come la concentrazione più bassa di genoma target, espresso in numero assoluto di copie, rilevata dalla metodica di interesse (re-

al-time LAMP o LAMP-LFD) in almeno il 50% dei replicati LAMP.

Per determinare la specificità dei diversi protocolli sono stati analizzati DNA appartenenti a tutte e tre le specie virali di interesse.

Tabella 2 - Set di primer per real-time LAMP e LAMP-LFD (inner primer marcati con FAM e Btn in posizione 5') per HVT, MDV-2 ed MDV-1

Virus - gene target	Tipologia di primer	Nome e sequenza del primer	Riferimento bibliografico
HVT - HVT070	Outer	HVT-F3: 5'-ATAAATTATATCGCTAGGACAGAC-3' HVT-B3: 5'-ACGATGTGCTGTCGTCTA-3'	Wozniakowski et al., 2013
	Inner	HVT-FIP: 5'-FAM-CCAGGGTATGCATATTCATAA-CA <i>GTTTTCCAAACGACCTTTATCCCA-3'</i> * HVT-BIP: 5'-Btn-CCAGAAATTGCACGCACGA- <i>GTTTT</i> AGAATTTGTGCATTTAGCCTT-3'	
	Loop	HVT-LF: 5'-TTGAGAAGAGGATCTGACTG-3' HVT-LB: 5'-GCGTCATTGGTTTTACATTT-3'	
MDV-2 - UL50	Outer	MDV2-F3: 5'-GTTCTCCGTCGATGAAGCG-3' MDV2-B3: 5'-GTCAATTCGCCAGCACAAC-3'	Wozniakowski et al., 2013
	Inner	MDV2-FIP: 5'-FAM-ATAACGCGAAGACAGCGCG- <i>GTTT</i> <i>TTATGCGAGGAACCCAGAAGG-3'</i> MDV2-BIP: 5'-Btn-ACTGTGCGATCTCGTTGCC- <i>CTTTT</i> GCCACTCGTACACCTAGA-3'	
	Loop	MDV2-LF: 5'-TTCTTCTATATAACAGGTCC-3' MDV2-LB: 5'-TATGAAATATGTGCGTTAGA-3'	
MDV-1 - UL49	Outer	MDV1-F3: 5'-GATGGGGGAAGCCGAAAC-3' MDV1-B3: 5'-CACTGACYACGATATCCGC-3'	Wozniakowski & Niczyporuk, 2015 (sequenze modificate nel presente studio)
	Inner	MDV1-FIP: 5'-FAM-CCGCCGCTCTGTACGT-TCTTTTG TGCCCCGAAACTATTGGAA-3' MDV1-BIP: 5'-Btn-AATCAAATCGCCAGATCCGG- <i>GATT</i> <i>TTGATGGCGACGCGAAGTTG-3'</i>	
	Loop	MDV1-LF: 5'-CCCCTGGGATAATCCAGACTC-3' MDV1-LB: 5'-CTCATCGTACACATAACCCTCGC-3'	

* Primer marcati utilizzati in LAMP-LFD con FAM = 6-carboxyfluorescein o Btn = Biotin

Test LAMP-LDF su DNA estratti da campioni diagnostici e su campioni diagnostici trattati termicamente

I DNA estratti dai 32 campioni diagnostici provenienti dal campo e le 11 aliquote di organi o polvere ambientale trattate termicamente sono stati testati con i protocolli LAMP-LFD per HVT, MDV-1 e MDV-2.

RISULTATI

Sensibilità dei protocolli di real-time LAMP e LAMP-LFD

La sensibilità dei 6 protocolli di real-time LAMP e dei 6 protocolli di LAMP-LFD messi a punto nel presente lavoro è riportata in Tabella 3 ed è espressa come LoD.

Tabella 3 - Sensibilità delle metodiche di real-time LAMP e LAMP-LFD

Metodica	LoD (numero copie di genoma)		
	Real-time LAMP	LAMP-LFD	MDVRL real-time PCR*
HVT (generico)	100	100	10 (gene sORF1)
HVT Vaxxitek®	100	100	Non disponibile
MDV-2	10	100	100 (gene DNA-pol)
MDV-1 (generico)	100	100	100 (gene pp38)
MDV-1 CVI988/Rispens	10000	-	100 (gene pp38)
MDV-1 di campo	10000	10000	100 (gene pp38)

* Paragone con la sensibilità dei protocolli real-time PCR del MDVRL

Specificità dei protocolli di real-time LAMP e LAMP-LFD

La specificità dei protocolli real-time LAMP e LAMP-LFD messi a punto nel presente lavoro è riportata in Tabella 4. Ogni protocollo ha permesso l'amplificazione specifica dei genomi target (Tabella 4)

Tabella 4 - Specificità dei protocolli di real-time LAMP e LAMP-LFD

DNA virali	Protocollo					
	HVT (generico)	HVT Vaxxitek®	MDV-2	MDV-1 (generico)	MDV-1 CVI988/Rispens	MDV-1 non vaccinale
HVT Fc126	✓	✗	✗	✗	✗	✗
rHVT-Vaxxitek®	✓	✓	✗	✗	✗	✗
rHVT-Innovax®	✓	✗	✗	✗	✗	✗
MDV-2 SB-1	✗	✗	✓	✗	✗	✗
CVI988/Rispens	✗	✗	✗	✓	✓*	✗*
MDV-1 di campo	✗	✗	✗	✓	✗*	✓*

✓ - Amplificazione del genoma target

✗ - Nessuna amplificazione

* - La specificità delle metodiche MDV-1 CVI988 e non vaccinale è stata testata su 4 vaccini CVI988/Rispens di differenti case farmaceutiche e su 11 ceppi di campo MDV-1 a diversa virulenza (v, vv e vv+)

Test LAMP-LFD su DNA estratti da campioni diagnostici

Dei 32 DNA estratti dai campioni diagnostici quelli positivi per HVT in real-time PCR (valori Ct compresi tra 24 e 38), sono risultati tutti positivi anche in LAMP-LFD. I campioni diagnostici positivi per MDV-2 in real-time PCR sono risultati positivi anche in LAMP-LFD quando i valori Ct erano compresi tra 20 e 29. Soltanto un campione con valore di Ct 36 in real-time PCR per MDV-2, è risultato negativo in LAMP-LFD. I campioni diagnostici positivi per MDV-1 e/o CVI988/Rispens in real-time PCR (valori Ct compresi tra 18 e 33), sono risultati tutti positivi anche in LAMP-LFD (test MDV-1 generico). La metodica MDV-1 DIVA ha fornito risultati concordanti con quelli della PCR real-time in real-time LAMP (i ceppi classificati come di campo con una metodica lo erano anche con l'altra così come i ceppi vaccinali CVI988/Rispens) ma non in LAMP-LFD dove si evidenziavano false positività dovute probabilmente alla formazione di prodotti aspecifici che si legavano alle linee della striscia del LFD generando una linea rosa visibile. I prodotti aspecifici risultavano invece chiaramente distinguibili dai prodotti specifici analizzando le curve di amplificazione e le relative analisi di melting in real-time LAMP.

Test LAMP-LFD su campioni diagnostici trattati termicamente

I tre protocolli LAMP-LFD per HVT, MDV-2 e MDV-1 eseguite a partire da matrici organiche e polveri ambientali sottoposte al solo trattamento termico e centrifugazione, hanno dato risultati concordanti con le metodiche real-time PCR e LAMP-LFD eseguite sul DNA estratto con kit commerciali.

DISCUSSIONE

Tutti i protocolli LAMP messi a punto nel presente lavoro per l'identificazione di HVT, MDV-1 e MDV-2 sono risultati altamente specifici e sensibili. La sensibilità analitica delle metodiche LAMP-LFD è risultata paragonabile a quella delle metodiche di real-time PCR utilizzate dal MDVRL OIE al Pirbright Institute per la diagnostica di routine (Baigent et al., 2016; López-Osorio et al., 2019) con l'unica eccezione della metodica LAMP DIVA per MDV-1 che, sebbene abbia mostrato un'alta specificità possedeva una bassa sensibilità.

Le tre metodiche LAMP-LFD messe a punto per l'identificazione di HVT, MDV-1 e MDV-2 sono state testate con successo anche a partire da campioni di campo trattati termicamente senza estrazione del DNA; tale peculiarità aggiunge convenienza e rapidità all'impiego in campo di questa metodica.

La messa a punto di metodiche LAMP per l'amplificazione differenziale di ceppi vaccinali, inclusi vaccini di nuova generazione quali Vaxxitek®, ottenuta nel presente lavoro ha una grande ricaduta pratica considerata l'importanza che sempre più sta acquisendo il monitoraggio della cinetica vaccinale nelle popolazioni vaccinate.

È stata sviluppata una metodica DIVA basata sul gene UL47 di MDV-1 per la differenziazione del ceppo vaccinale CVI988/Rispens dai ceppi di campo MDV-1. Questo segmento genomico è stato individuato per la prima volta in questo studio come target ottimale per differenziare i ceppi di campo MDV-1 dal ceppo vaccinale CVI988/Rispens. Appartenendo alla stessa specie virale il genoma del vaccino CVI988/Rispens presenta la stessa organizzazione genica di MDV1 non vaccinale, ed un'alta percentuale di identità nucleotidica con esso (Spatz et al., 2007) per questa ragione lo sviluppo di metodiche molecolari DIVA sensibili e specifiche risulta

complicato. I test DIVA più efficienti e affidabili sviluppati fino ad ora si basano sull'amplificazione in PCR end-point e successivo sequenziamento del gene *meq* di MDV-1 o sulla amplificazione differenziale in real-time PCR utilizzando sonde TaqMan® o saggi MAMA (Gimeno et al 2014; Baigent et al., 2016, Davidson et al., 2018). La frequenza con cui si verificano nelle popolazioni vaccinate coinfezioni con più ceppi vaccinali di diversa specie e con ceppi vaccinali e ceppi di campo MDV-1, rende sempre più necessaria la messa a punto di test LAMP con approccio DIVA.

CONCLUSIONI

Le metodiche LAMP-LFD messe a punto nel presente studio rappresentano un passo avanti nella diagnosi molecolare di MD e nel monitoraggio della cinetica vaccinale nelle popolazioni vaccinate. Le metodiche LAMP-LFD rendono infatti possibile la diagnosi accurata direttamente in campo o in piccoli laboratori diagnostici grazie alla rapidità di esecuzione del test e alla semplicità di interpretazione del risultato.

BIBLIOGRAFIA

1. Angamuthu R, Baskaran S, Gopal DR, Devarajan J, Kathaperumal K. (2012). Rapid detection of the Marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 50(3):961-5.
2. Baigent SJ, Nair VK, Le Galludec H. (2016). Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *J Virol Methods.* 233:23-36.
3. Baigent SJ, Petherbridge LJ, Howes K, Smith LP, Currie RJ, Nair VK. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *J Virol Methods.* 123(1):53-64.
4. Becherer L, Borst N, Bakheit M, Frischmann S, Zengerle R and von Stetten F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods* 12, 717-746
5. Cha RS, Zarbl H, Keohavong P, Thilly WG. (1992). Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl.* 2(1):14-20.
6. Chuard A, Courvoisier-Guyader K, Rémy S, Spatz S, Denesvre C, Padeloup D. (2020). The Tegument Protein pUL47 of Marek's Disease Virus Is Necessary for Horizontal Transmission and Is Important for Expression of Glycoprotein gC. *J Virol.* 95(2):e01645-20.
7. Cortes AL, Montiel ER, Lemiere S, Gimeno IM. (2011). Comparison of blood and feather pulp samples for the diagnosis of Marek's disease and for monitoring Marek's disease vaccination by real time-PCR. *Avian Dis.* 55(2):302-10.
8. Davidson I, Natour-Altoury A, Raibstein I, Dahan Y. (2017). Differential amplification of Marek's disease CVI988 vaccine and of wild-type isolates from organs of commercial chickens using single or duplexed probes in real-time PCR. *Avian Pathol.* 46(6):610-614.
9. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 62(1):41-8.

10. Gimeno IM, Dunn JR, Cortes AL, El-Gohary Ael-G, Silva RF. (2014). Detection and differentiation of CVI988 (Rispens vaccine) from other serotype 1 Marek's disease viruses. *Avian Dis.* 58(2):232-43.
11. Handberg KJ, Nielsen OL, Jørgensen PH. (2001). The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.* Jun;30(3):243-9.
12. Islam A, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. (2006). Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J Virol Methods.* 132(1-2):127-34.
13. López-Osorio S, Villar D, Piedrahita D, Ramírez-Nieto G, Nair V, Baigent S, Chaparro-Gutiérrez J. (2019). Molecular detection of Marek's disease virus in feather and blood samples from young laying hens in Colombia. *Acta Virol.* 63(4):380-391.
14. Nagamine K, Hase T, Notomi T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16(3):223-9. doi: 10.1006/mcpr.2002.0415. PMID: 12144774.
15. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12):E63.
16. Renz KG, Islam A, Cheetham BF, Walkden-Brown SW. (2006). Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. *J Virol Methods.* 135(2):186-91.
17. Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V. (2007). Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *J Gen Virol.* 88(Pt 4):1080-1096.
18. Wei X, Shi X, Zhao Y, Zhang J, Wang M, Liu C, Cui H, Hu S, Quan Y, Chen H, Wang Y. (2012). Development of a rapid and specific loop-mediated isothermal amplification detection method that targets Marek's disease virus meq gene. *J Virol Methods.* 183(2):196-200.
19. Walkden-Brown, S.W, Groves,P.J., Islam A.F.M.F, Burgess S.K., Arzey K.E., Mascord, L., Young P.L., (2003). Differentiation of Marek's disease virus serotypes using PCR: research and field experience. Proceedings of the 15th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, 10-12 febbraio 2003, 15, 192-196.
20. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 124(3):626-643.
21. Woźniakowski G, Niczyporuk JS. (2015). Detection of specific UL49 sequences of Marek's disease virus CVI988/Rispens strain using loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 221:22-8.
22. Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdruń W. (2013). Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian Dis.* 57(2 Suppl):539-43.

CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO NEL BACINO DEL MEDITERRANEO

Quaglia G.¹, Mescolini G.¹, Di Francesco A.¹, Catelli E.¹, Salvatore D.¹, Prentza Z.^{2,3}, Sakhria S.⁴, Berto G.⁵, Muccioli F.⁶, Koutoulis K.², Papparonis T.³, Ben Chehida N.⁴, Lupini C.¹

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

² *Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, Karditsa, Greece;*

³ *Agricultural Poultry Cooperation of Ioannina "PINDOS", Rodotopi, Ioannina, Greece;*

⁴ *University of Tunis El Manar, Institute of Veterinary Research of Tunisia, Tunis, Tunisia;*

⁵ *Azienda Alss 8 Berica, Vicenza;*

⁶ *Martini S.p.A., Budrio di Longiano (FC)*

Summary

Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV), a member of the genus *Gyrovirus*, is the etiological agent of a disease affecting chicken, named chicken infectious anemia. The virus infects bone marrow-derived cells, resulting in severe anemia and immunosuppression in young chickens and compromised immune response in older birds. This study reports the molecular characterization of 53 CIAV strains detected in Italian, Greece and Tunisian chickens of different production types, from environmental dust, cloacal swabs, feathers or tissues. Samples were examined by a nested-PCR protocol targeting a partial sequence of the VP1 gene of CIAV; subsequently the amplification of the complete genome of selected positive sample was attempted. Sequence and phylogenetic analysis of VP1 showed that Italian and Greece strains had heterogenic sequences clustering into genogroups II, IIIa, and IIIb, and possess aminoacidic residues peculiar of virulent strains; Tunisian CIAV strains detected during the study clustered with CIAV strains previously detected in Tunisia, belonging to genogroup II. Viral DNA amplification was successfully obtained from non-invasive samples like feathers and environmental dust. These sampling protocols, being very convenient, deserve to be further investigated in terms of sensitivity for CIAV detection.

INTRODUZIONE

Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV), agente eziologico dell'anemia infettiva del pollo, è un virus a DNA di piccole dimensioni, 2298 nucleotidi (nt), appartenente alla famiglia *Anelloviridae*, genere *Gyrovirus* (Rosario *et al.*, 2017). Il genoma è costituito da tre *Open Reading Frame* che codificano per tre proteine virali denominate: VP1, VP2 e VP3.

VP1 è la proteina del capsido (Renshaw *et al.*, 1996), con funzioni nella infezione e replicazione virale. Presenta una regione genomica ipervariabile costituita da 13 amminoacidi (aa) situata in posizione 139-151 (Noteborn *et al.*, 1991), frequentemente esaminata in corso di studi di caratterizzazione molecolare virale (Schat, 2003). Le pro-

teine virali VP2 e VP3 sono non strutturali (Noteborn *et al.*, 1994). La proteina VP2 è implicata nella replicazione virale e nella virulenza (Peters *et al.*, 2006), mentre la proteina VP3, anche chiamata apoptina, induce apoptosi in cellule linfoblastoidi T e cellule mieloidi (Noteborn *et al.*, 1994).

CIAV si trasmette per via verticale ed orizzontale e l'infezione è in grado di provocare una forma clinica quando si verifica nelle prime settimane di vita. Il virus determina anemia e gli animali colpiti presentano depressione, atrofia del timo e del midollo osseo ed emorragie diffuse. Quando l'infezione avviene dopo le 3 settimane di età, la malattia si manifesta prevalentemente in forma subclinica, causando solo una significativa immunosoppressione, che ovviamente accompagna anche la forma clinica. Le cellule target del virus sono gli emocitoblasti nel midollo osseo e i precursori dei linfociti T nel timo (Balamurugan and Kataria, 2006). Ad oggi è conosciuto un unico sierotipo di CIAV (Yuasa and Imai, 1986), tuttavia, sulla base della sequenza nucleotidica della VP1 ed all'analisi filogenetica, è possibile distinguere 4 genogruppi (Ducatez *et al.*, 2006; Ou *et al.*, 2018).

L'obiettivo del presente lavoro è stato caratterizzare dal punto di vista molecolare, mediante sequenziamento della VP1 o del genoma completo, ceppi CIAV provenienti da Grecia, Tunisia ed Italia. I campioni di origine erano costituiti da diverse matrici biologiche raccolte da allevamenti di polli di diversi indirizzi produttivi.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 216 campioni provenienti dall'Italia (45), dalla Grecia (36) e dalla Tunisia (135), costituiti da organi, tamponi cloacali, penne e polvere ambientale, prelevati da allevamenti intensivi di polli da carne e di riproduttori pesanti, e da allevamenti rurali.

Estrazione del DNA virale

L'estrazione del DNA virale è stata eseguita utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL). Quando il campione in esame era costituito da polveri ambientali, prima dell'estrazione del DNA il campione è stato trattato come descritto da Mescolini *et al.* (2019).

PCR nested per CIAV

Sul DNA estratto è stata eseguita una PCR nested per amplificare parte del gene codificante la VP1 seguendo il protocollo descritto di seguito ed utilizzando i primer riportati in Tabella 1. Per ogni reazione di PCR dal volume finale di 25 µl, veniva preparata la seguente mix di reazione: 0,5 µl di primer senso, 0,5 µl di primer antisenso, 5 µl 5X PCR GoTaq® Reaction Buffer (Promega); 0,125 µl di GoTaq® DNA Polymerase (Promega); 0,5 µl di dNTP (Promega); 11,625 µl di acqua per biologia molecolare. A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 5 µl di DNA estratto dal campione.

I cicli della PCR1 consistevano in: pre-denaturazione a 94°C per 2 min, 35 cicli di amplificazione caratterizzati da una fase di denaturazione (a 94°C per 1 min), una di appaiamento (a 50°C per 1 min) ed una di estensione 72°C per 1,30 min, seguita da una fase di estensione finale a 72°C per 5 min. I cicli della PCR2 erano uguali a quelli precedentemente descritti eccetto la fase di estensione di 72°C per 40 sec.

Tabella 1. Primer utilizzati nel protocollo di PCR nested per CIAV.

	SEQUENZA (5'-3')	POSIZIONE NEL GENOMA	DIMENSIONE AMPLIFICATO (bp)
CIAV 1 FOR	CAGGGTAAGCGAGCTAAAAG	751-770	1528
CIAV 1 REV	GCTGCGTTTATTGAGTGTC	2262-2279	
CIAV 2 FOR	GGTACGTATAGTGTGAGGC	996-1014	790
CIAV 2 REV	GCTGTGAGTGTTGCAAAGCT	1767-1786	

Amplificazione del genoma completo di CIAV

Al fine di ottenere l'amplificazione del genoma completo di CIAV, i campioni provenienti da Italia e Tunisia risultati positivi alla PCR nested per CIAV, sono stati sottoposti a 3 PCR *overlapping* utilizzando i *primers* disegnati Li et al. (2017).

Analisi di sequenza e filogenetica

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio ExoSAP-IT™ *Express* PCR Cleanup (ThermoFisher Scientific), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate, mediante il software Bioedit, con sequenze omologhe presenti nel database GenBank. Con le sequenze nucleotidiche della VP1, parziale per i ceppi della Grecia e completa per i ceppi italiani e tunisini, sono stati costruiti 3 alberi filogenetici, distinti per area geografica, utilizzando l'algoritmo di Neighbor-joining del software Mega X (Kumar et al., 2018). I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

RISULTATI

Su un totale di 213 campioni esaminati, 53 (25 dei quali provenienti dall'Italia, 13 dalla Grecia e 15 dalla Tunisia) sono risultati positivi alla nested-PCR per CIAV (Tabella 2); da tutti prodotti di PCR è stata ottenuta con successo la sequenza della porzione del gene VP1 amplificata; da tutti i campioni provenienti dalla Tunisia, e da 11 campioni italiani, è stato possibile ottenere l'amplificazione e la sequenza del genoma completo.

Tabella 2. Campioni provenienti da Italia, Tunisia e Grecia risultati positivi a PCR nested per CIAV: Matrici biologiche e categorie produttive.

CEPPO CIAV	Matrici	Categoria produttiva	Origine
CIAV/IT/CK/855/17	Penne	Polli Rurali	Italia
CIAV/IT/CK/906-06/18	Borsa di Fabrizio	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/909-06/18	Penne	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1196/19	Tampone cloacale	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/986-1/18	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/986-2/18	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/986-6/18	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1099/19	Polvere	Broiler	Italia

CIAV/IT/CK/1100/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1101/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1153-1/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Italia
CIAV/IT/CK/1153-2/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Italia
CIAV/IT/CK/1155/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1157/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1179/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1180/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1185/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1186/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1187/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1188/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1189/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1191/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1192/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1195/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1201/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/GR/CK/1410/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1416/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1422/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1412/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1418/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1424/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1414/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1420/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1344/19	Milza e fegato	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1349/19	Milza e fegato	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1351/19	Milza e fegato	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1426/19	Polvere	Broiler	Grecia
CIAV/GR/CK/1428/19	Polvere	Broiler	Grecia
CIAV/TN/7-1	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-2	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-3	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-4	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-5	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-6	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-7	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-8	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-9	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-10	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-11	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-12	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-13	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-14	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-15	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia

L'analisi filogenetica condotta sulla sequenza nucleotidica della proteina VP1 ha rivelato una certa eterogeneità molecolare dei ceppi CIAV circolanti in Italia ed in Grecia (Figura 1) che clusterizzano con ceppi del genogruppo II e del genogruppo IIIa e IIIb. I ceppi di CIAV evidenziati in Tunisia, tutti ottenuti da polli rurali (Figura 2) hanno mostrato identità molecolare con ceppi precedentemente isolati in Tunisia nel 2009 e nel 2013, appartenenti al genogruppo II (Nsiri, 2009, 2013).

Figura 1. Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche parziali del gene VP1 di ceppi CIAV identificati in Grecia ed analizzati nel presente studio (marcati con triangolo rosso) e di ceppi di riferimento presenti sul database *GenBank*.

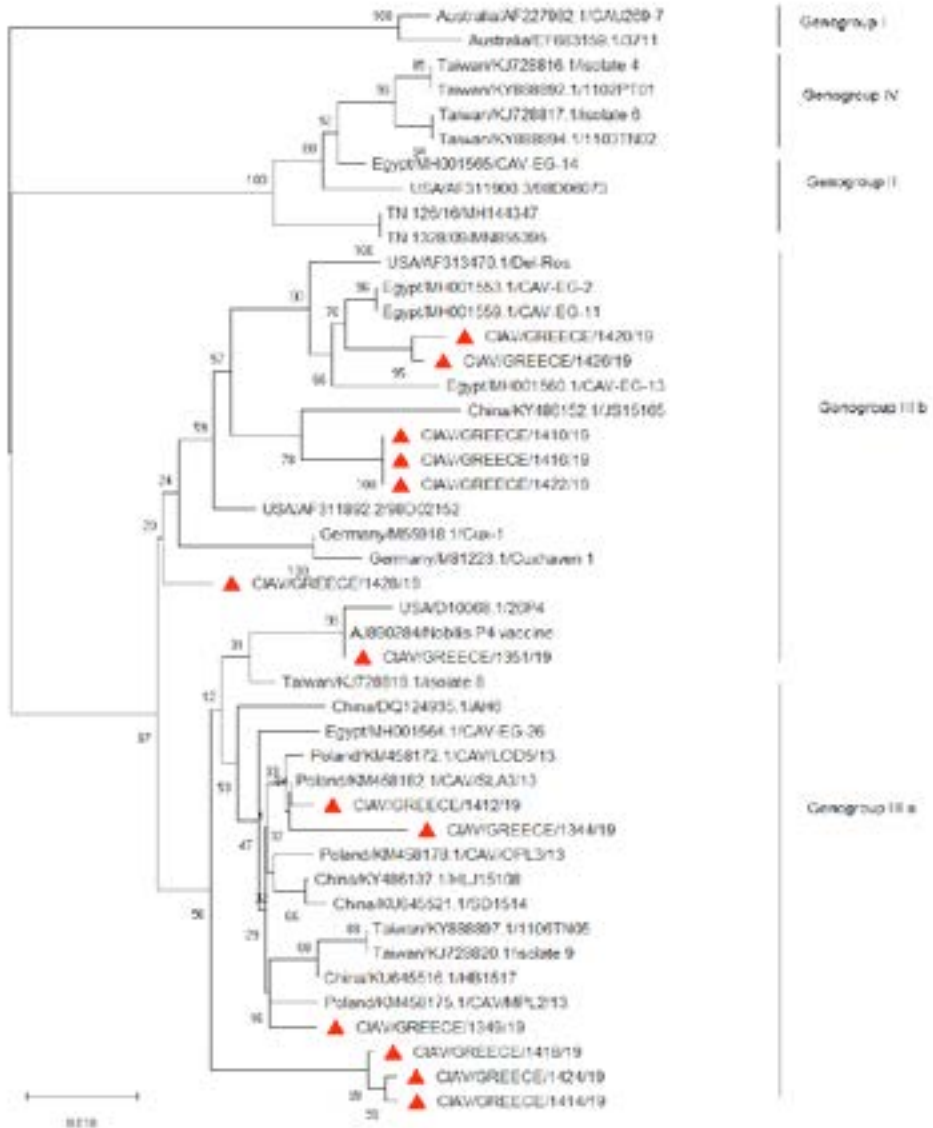
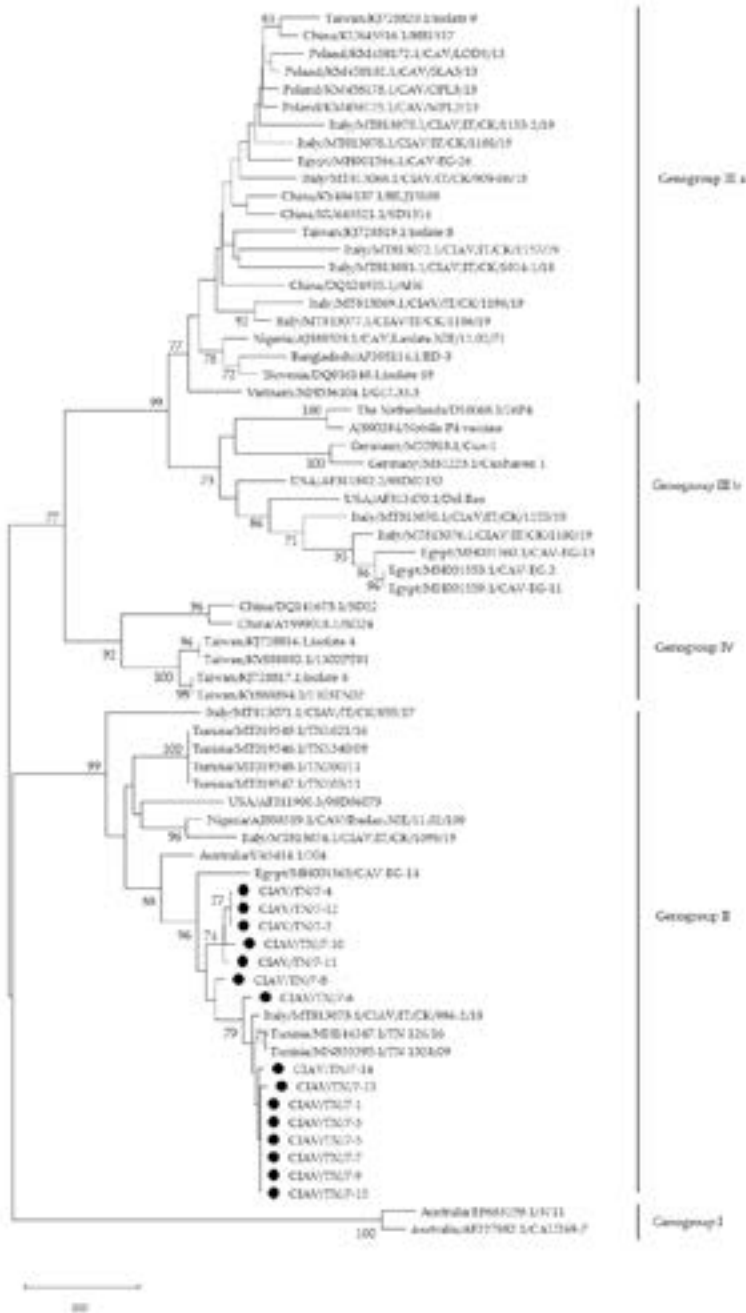


Figura 2. Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche complete del gene VP1 di ceppi CIAV identificati in Tunisia ed analizzati nel presente studio (marcati con cerchio nero) e di ceppi di riferimento presenti sul database *GenBank*.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro vengono caratterizzati ceppi CIAV provenienti da diverse aree geografiche del bacino del Mediterraneo. L'analisi filogenetica ha evidenziato una certa eterogeneità genetica nei ceppi circolanti in Italia e in Grecia, appartenenti ai genogruppi II, IIIa e IIIb; In Tunisia, dove il virus era stato già caratterizzato in passato, è stata confermata la circolazione di ceppi appartenenti al genogruppo II.

L'amplificazione del DNA virale di CIAV è stata ottenuta con successo oltre che da matrici convenzionali quali organi, anche da penne, tamponi cloacali e, soprattutto da polveri ambientali. Queste ultime modalità di campionamento non sono invasive e risultano essere di facile esecuzione (Davidson, 2019), per cui meritano di essere ulteriormente studiate essendo valide alternative ai campionamenti tradizionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Balamurugan, V. and Kataria, J. M., (2006). Economically important nononcogenic immunosuppressive viral diseases of chicken—current status. *Veterinary Research Communications*, 30(5), 541–566.
2. Davidson I. (2019). Biotic concerns in generating molecular diagnosis matrixes for 4 avian viruses with emphasis on Marek's disease virus. *J Virol Methods*. [Epub ahead of print].
3. Ducatez M. F., Owoade A. A., Abiola J. O., Muller C. P. (2006). Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch. Virol.* 151:97-111.
4. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549.
5. Li, Y., Fang, L., Cui, S., Fu, J., Li, X., Zhang, H., Cui, Z., Chang, S., Shi, W., & Zhao, P. (2017). Genomic characterization of recent chicken anemia virus isolates in China. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00401>.
6. Mescolini G., Lupini C., Quaglia G., Berto G., Tovani A., Ceroni S., Muccioli F., Catelli E. (2019). Monitoraggio ambientale della circolazione del virus della Malattia di Marek in allevamenti di broiler e di riproduttori pesanti. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2019. IV Simposio Scientifico, Bologna 22 Novembre 2019*.
7. Noteborn M. H., de Boer G. F., van Roozelaar D. J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J. G., van der Eb A. J. (1991). Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology*, 65, 3131-3139.
8. Noteborn M. H., Todd D., Verschueren C.A., de Gauw H.W., Curran W.L., Veldkamp S., Douglas A.J., McNulty M.S., van der Eb A.J., Koch G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology*, 68:346-351.
9. Ou, S. C., Lin, H. L., Liu, P. C., Huang, H. J., Lee, M. S., Lien, Y. Y., & Tsai, Y. L. (2018). Epidemiology and molecular characterization of chicken anaemia virus from commercial and native chickens in Taiwan. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1493–1501.
10. Peters, M. A., Crabb, B. S., Washington, E. A., & Browning, G. F. (2006). Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of Chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *Journal of General Virology*, 87, 823–831.

11. Renshaw, R. W., Soiné, C., Weinkle, T., O'Connell, P. H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio B., Harrington S., Schat K.A. (1996). A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J. Virol.* 70, 8872–8878.
12. Rosario K., Breitbart M., Harrach B. (2017). Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch. Virol.* 10.1007/s00705-017-3247-y.
13. Schat K.A. (2003). Chicken infectious anemia. In: Saif Y.M., editor. *Diseases of poultry*. Iowa: Iowa State Press; 2003. p. 182–202.
14. Yuasa N., Imai K. (1986). Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* 15:639-645.
15. Nsiri, J.; Maher, K.; Larbi, I.; Gribâa, L.; El Béhi, I.; Ben Rhouma, W.; Ghram, A. (2009). L'anémie infectieuse aviaire en Tunisie : Résultats préliminaires. 1ère Journée Nationale Avicole, Tunisie,
16. Nsiri, J.; Elhadj, E.; Larbi, I.; Tombari, W.; El Behi, I.; Arbi, M.; Fathalah, I.; Ammouna, F.; Triki, S.; Ghram, A. (2013) Isolement et caractérisation moléculaire du virus de l'anémie infectieuse aviaire. 5ème Journée Nationale Avicole, Tunisie.

MOLECOLE VEGETALI NELLA STIMOLAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ DI CELLULE DENDRITICHE AVIARIE

Ghiselli F.¹, Rossi B.², Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{1,3}

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

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

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

Summary

Botanicals are commonly used in animal production for their antimicrobial, anti-inflammatory and immune-boosting properties. Dendritic cells (DC) are specialized antigen-presenting cells and sentinel cells that regulate the immune response. In this study avian DC were generated from bone marrow precursors cultured in media containing both GM-CSF and IL4, then the immature DC were stimulated with *E. coli* O55:B5 lipopolysaccharide (LPS) to induce maturation. The effect of different molecules on DC maturation were analyzed. Thymol and grape seed extract were found to interfere with the maturation and differentiation of immature DC in the presence of LPS. These preliminary findings may address specific formulation of feed additives able to modulate the immune-system by promoting immune-tolerance, with the aim to ameliorate or prevent inflammatory events in poultry.

INTRODUZIONE

L'utilizzo di molecole di origine vegetale è molto comune nel trattamento e nella prevenzione di patologie aviarie. Queste molecole sono da tempo studiate per le loro proprietà antimicrobiche e negli ultimi anni sono sempre più discusse, in letteratura, anche le loro potenzialità immuno-modulatorie [1–3]. Tante problematiche nell'allevamento di specie aviarie derivano da patologie sub-cliniche spesso correlate a stati infiammatori difficilmente diagnosticabili [4–6]. La modulazione del sistema immunitario potrebbe pertanto risultare un approccio chiave nel prevenire l'insorgenza di queste patologie o nel ridurre gli effetti.

Tra le cellule coinvolte nella risposta immunitaria ritroviamo le cellule dendritiche (DC), le quali sono uno dei tre tipi di cellule fagocitiche mononucleate ed hanno un importante ruolo sia nell'immunità che nella tolleranza immunologica. Esse si dividono in sottopopolazioni distinte, le DC immature (imDC) e le DC mature (mDC). Le imDC si trovano nei tessuti periferici dove lavorano come sentinelle e facilitano la tolleranza immunitaria [7]. Dopo l'incontro con l'antigene, le imDC subiscono un processo di attivazione diventando così mDC. Le mDC sono necessarie, in modo critico, per l'innesco dei linfociti T naïve. Dopo l'attivazione, le cellule T naïve iniziano a proliferare e differenziarsi in cellule effettrici, necessarie per la promozione della risposta immunitaria adattativa contro i patogeni [8]. Di contro l'induzione di un fenotipo tollerogenico nelle DC, tramite la modulazione della maturazione, permette di ridurre o sopprimere l'innesco della risposta immunitaria, prevenendo stati infiammatori clinici o sub-clinici. Quando una imDC

diventa mDC attivata subisce diversi cambiamenti fenotipici e funzionali. Uno dei principali cambiamenti porta all'aumento o alla diminuzione dei marcatori di maturazione, tra cui CD40, CD80, CD83 e CD86. Inoltre, le mDC si caratterizzano per la produzione di citochine e capacità di attivare le cellule T CD4⁺. La riduzione o la mancata espressione del CD86 dopo l'esposizione ad un agente infiammatorio è correlata invece ad un fenotipo tollerogenico delle DC [9] quindi immunotollerante.

La modulazione delle DC, da parte di molecole vegetali è stata già documentata in alcuni studi su cellule di uomo [10,11] e topo [12]. In generale, tali composti vegetali e i loro costituenti possono migliorare la differenziazione delle mDC dai precursori [1] o modulare le funzioni delle mDC stesse per indurre o sopprimere la risposta immunitaria, generando un fenotipo attivato o tollerogenico [13].

Tenendo presente l'importante ruolo e le funzioni delle DC nel sistema immunitario, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto di timolo e estratto di semi d'uva (ESU) sulla differenziazione e maturazione di DC aviarie derivate dal midollo osseo, inducendole ad un fenotipo tollerogenico. Tali molecole sono state messe a confronto con gli effetti del desametasone, un noto antinfiammatorio steroideo, e della colistina, un antibiotico della classe delle polimixine, efficace contro i coliformi (es. *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*). La colistina, a differenza di altri composti, che agiscono sulla sintesi proteica batterica, come la bacitracina, ha un'azione diretta contro la struttura dell'LPS, rendendola quindi un candidato interessante, per valutare una eventuale inibizione, da parte di un antibiotico, della maturazione delle cellule dendritiche stimolata dal solo LPS e non dalla presenza di un patogeno. Per raggiungere questo scopo, è stato ottimizzato un protocollo per la generazione di DC dai precursori del midollo osseo di pollo. In secondo luogo, tali DC sono state utilizzate come strumento di screening di molecole ad azione antinfiammatoria.

MATERIALI E METODI

Estrazione dei precursori dal midollo osseo di pollo

Uova SPF sono state acquistate da ValoBiomedica (Osterholz-Scharmbeck, Germania) e incubate in un'incubatrice semiautomatica per 19 giorni. Al 19° giorno di incubazione gli embrioni di pollo sono stati soppressi mediante congelamento a -80°C per 25 minuti e successiva dislocazione cervicale. Tutte le procedure sono state eseguite in conformità con il D.lgs. 26/2014, attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

Dagli embrioni sono state recuperate le tibie e da esse è stato rimosso il tessuto muscolare circostante, utilizzando strumenti sterili. Le tibie sono state quindi lavate in una piastra Petri contenente una soluzione salina tampone fosfato (PBS, senza Ca²⁺ Mg²⁺; Sigma-Aldrich) e addizionata di penicillina (1 U/mL; Sigma-Aldrich), streptomicina (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) e anfotericina (1 µg/mL - Sigma-Aldrich). Le ossa sono state poi processate sotto cappa biologica BSL-2 in condizioni di sterilità. Il midollo è stato recuperato con PBS a temperatura ambiente utilizzando una siringa. Le cellule in PBS sono state separate per gradiente di densità con Histopaque (Sigma-Aldrich) e centrifugate a 700g per 30 minuti a 25°C. Le cellule all'interfaccia sono state raccolte, lavate con PBS antibiotato e, infine, 10 µl di sospensione cellulare sono stati miscelati 1:1 con una soluzione trypan blue 0.4%

(Sigma-Aldrich) e contaminate in una camera di Bürker. Quelle risultate negative alla colorazione sono state contaminate come vitali.

Generazione e maturazione di cellule dendritiche derivate dal midollo osseo di pollo (chBM-DC)

Le cellule ottenute dalle tibie sono state coltivate a una concentrazione finale di 5×10^5 cellule/ml in flask a bassa adesione cellulare (Sarstedt) per 7 giorni a 37°C e 5% CO₂. Il terreno di coltura è composto da RPMI-1640 (Corning) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS - Sigma-Aldrich), 1% amminoacidi non essenziali (Sigma-Aldrich), 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1 U/ml penicillina e 1 µg/ml streptomicina. Per favorire la maturazione delle cellule dendritiche (chBM-DC), al terreno di coltura sono stati aggiunti 50 ng/mL Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) e 10 ng/mL IL-4 di pollo.

Dopo 7 giorni di coltura, le cellule in sospensione o blandamente adese sono state recuperate con una digestione di 5 minuti con accutasi (Corning). Per indurre la maturazione, al giorno 7 le cellule in coltura sono state divise in due gruppi. Un gruppo è stato mantenuto in terreno di coltura come controllo negativo (CTR), mentre un secondo gruppo è stato stimolato con 500 ng/ml di LPS di *E. coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) per 24 ore. All'ottavo giorno di coltura è stata osservata la morfologia cellulare e poi le cellule sono state raccolte per la successiva estrazione dell'RNA utile per le analisi di espressione genica.

Valutazione dell'effetto di molecole vegetali sulla maturazione di chBM-DC

Dopo 7 giorni di coltura in terreno addizionato con fattori di crescita, le imDC sono state utilizzate per valutare gli effetti di diverse molecole sulla loro maturazione. Le imDC venivano divise in 4 gruppi (n=6): 1) un gruppo di controllo negativo (CTR-) tenuto in terreno completo; 2) un gruppo trattato con solo LPS, per indurre la stimolazione, usato come controllo positivo (LPS); 3) un gruppo trattato con la molecola d'interesse (TRT); 4) un gruppo trattato con LPS e la molecola d'interesse (LPS+TRT). In particolare, sono state testate timolo 10 ppm e 100 ppm di estratto di semi d'uva (ESU). L'antinfiammatorio desametasone 1 µM è stato utilizzato come controllo di inibizione della maturazione, mentre colistina 4ppm è stato utilizzato con controllo degli effetti di un antibiotico sulla maturazione delle cellule dendritiche.

Caratterizzazione e valutazione dell'espressione genica di marcatori della maturazione mediante qPCR

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) come descritto dal produttore. Dopodiché l'RNA estratto è stato quantificato tramite spettrofotometria (µDrop™ Varioskan Lux, Thermo-Scientific) e 500 ng sono stati poi retro-trascritti a cDNA utilizzando il kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories), come da specifiche del produttore. La qPCR è stata eseguita utilizzando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) e i primers dei vari geni sono stati utilizzati ad una concentrazione di 500 nM. Il ciclo di amplificazione prevedeva 5 minuti a 95°C, poi 40 cicli composti da 5 secondi a 95°C e 30 secondi a 60°C. L'elenco dei primers utilizzati è riportato in tabella 1 (Tab 1). I risultati sono stati espressi utilizzando il metodo del $\Delta\Delta Ct$ [14].

	<i>Gene</i>	<i>Sequenze primers (5'-> 3')</i>	<i>Lunghezza prodotto (bp)</i>	<i>Accession N.</i>
Molecole co- stimolatorie	CD40	F: AGACCTGCGTGGAGAACGAG R: GTGAGGTCATCCGGGCTCA	78	NM_204665.2
	CD83	F: CGAAACAAGCCAGCCAAGCA R: GCCTCCTTGTCACAGCCTGA	100	XM_418929.7
	CD86	F: ACCTTGCCAGGAAAAACACG R: TGCCCTCATCCACAATCCC	115	NM_001037839.1
	MHC-II	F: GGGCGGTCTGTGCTCTTCTA R: TCGACTCTCTCCACCACTCCT	139	NM_001044679.2
Citochine	IL1 β	F: TGCCTGCAGAAGAAGCCTCG R: CTCGCAGCAGTTTGTCAT	137	NM_204524.1
	IL6	F: GCAGGACGAGATGTGCAAGA R: ACCTTGGGCAGGTTGAGGTT	84	NM_204628.1
	INF γ	F: ACAACCTTCCTGATGGCGTG R: AGTTCATTGCGGGCTTTGCG	100	NM_205149.1

Tabella 1: Sequenze primers utilizzate per la caratterizzazione biomolecolare. CD=cluster di differenziazione; MHC-II=complesso maggiore di istocompatibilità di seconda classe; IL=interleuchina; INF γ =interferon-gamma;

RISULTATI

Generazione e maturazione di cellule dendritiche derivate dal midollo osseo di pollo
Le cellule isolate dal midollo osseo sono state coltivate per 7 giorni in presenza dei fattori stimolatori GM-CSF e IL4. Dopo circa 4 giorni erano visibili in coltura degli aggregati cellulari (Fig 1a) tipici della proliferazione di cellule dendritiche. Dopo 7 giorni in coltura, le chBM-DC sono state recuperate mediante digestione in accutasi e sono state indotte a maturare mediante LPS (Fig 1b). Dopo 24h di esposizione ad LPS le cellule hanno assunto una morfologia più allungata e aderente, tipica delle mDC (Fig 1c).

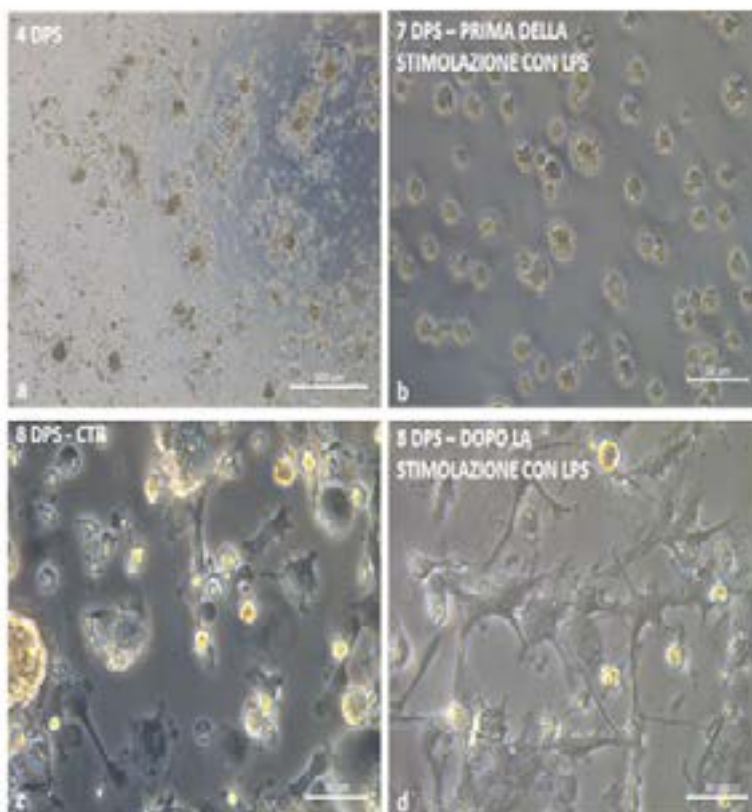


Figura 1: chBM-DC a diversi stadi di maturazione. DPS=days post seeding. a) 4 giorni dopo l'isolamento, in presenza di GM-CSF e IL4; b) imDC prima della stimolazione a 7 giorni di coltura; c) mDC dopo 24h di stimolazione con LPS 500 ng/mL.

Valutazione dell'effetto di molecole vegetali sulla maturazione di chBM-DC

In figura 2 è possibile osservare gli effetti di molecole vegetali sulle cellule dendritiche. Dopo 24h di stimolazione con LPS in presenza di 10 ppm di timolo si è osservata una morfologia allungata (Fig 2a) simile a quella della sola stimolazione con LPS. Le cellule trattate invece con 100 ppm di ESU (Fig 2b) hanno mostrato una morfologia tondeggianta, simile a quelle non stimolate (Fig 1b), anche dopo stimolazione con LPS. La stessa morfologia si è vista in cellule trattate con desametasone 1 μ M (Fig 2c) mentre quelle trattate con colistina 4 ppm hanno invece mostrato una morfologia mista (Fig 2d).

Le singole molecole utilizzate sulle cellule, senza stimolazione con LPS, non hanno indotto cambiamenti morfologici rispetto al CTR - (dati non mostrati).

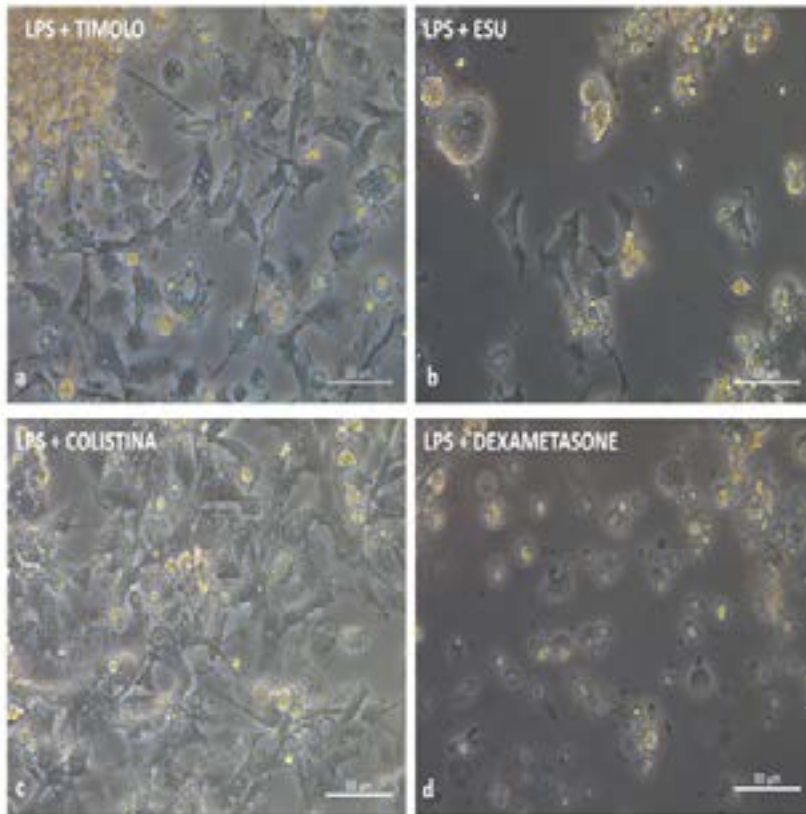


Figura 2: chBM-DC dopo stimolazione con LPS in presenza di altre molecole. a) LPS 500 ng/mL + Timolo 4ppm; b) LPS 500 ng/mL + NORGRAPE 100ppm; c) LPS 500 ng/mL + COLISTINA 4ppm; d) LPS 500 ng/mL + Desametasone 1uM
Caratterizzazione e valutazione dell'espressione genica di marcatori e citochine mediante qPCR

Dalle qPCR riportate in figura 3 è possibile vedere gli effetti di inibizione sull'espressione di molecole co-stimolatorie delle chBM-DC delle varie molecole testate.

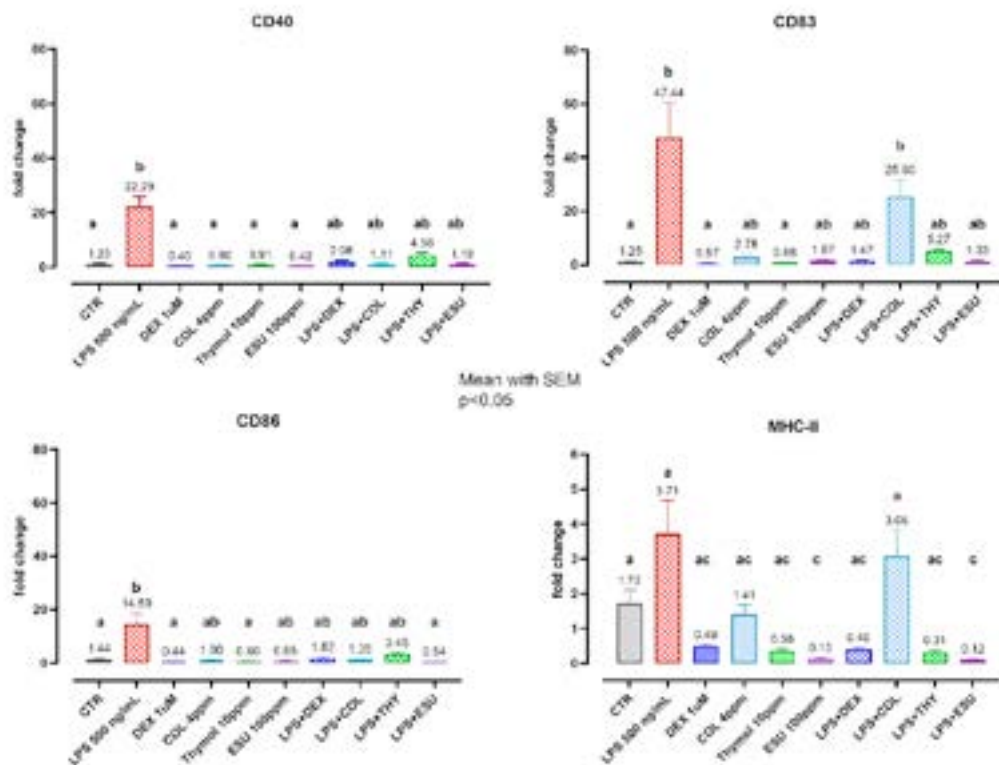


Figura 3: Espressione genica di molecole co-stimolatorie. DEX=Desametasone, COL=colistina, ESU=Estratto di semi di uva. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ($p<0.05$ - Test di Kruskal-Wallis)

In dettaglio, il desametasone ha inibito la produzione di tutte le citochine prese in esame e ridotto la maturazione delle cellule dendritiche riducendo l'espressione del CD40, CD83, CD86 e MHC-II, provando quindi la sua efficacia come antinfiammatorio. La colistina 4ppm non è invece stata completamente efficace nel ridurre l'espressione di C83 e MHC-II. Le molecole vegetali sono state invece in grado di ridurre l'espressione di tutte le molecole co-stimolatorie testate, in maniera simile al desametasone.

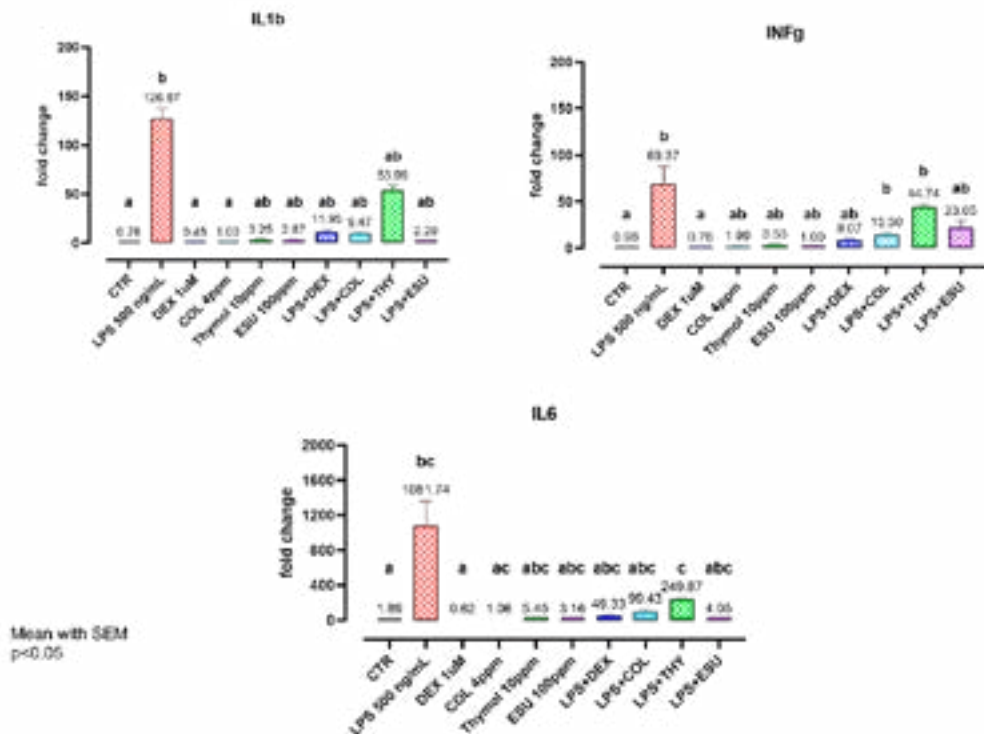


Figura 4: Espressione genica di citochine pro-infiammatorie. DEX=Desametasona, COL=colistina, ESU=Estratto di semi di uva. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$ - Test di Kruskal-Wallis)

In figura 4 vengono invece riportati i risultati dell'espressione genica riguardante le citochine pro-infiammatorie. Qui è possibile notare che ESU, come il desametasona, è efficace nell'inibire l'espressione di tali citochine, mentre colistina e timolo hanno avuto un effetto meno marcato.

DISCUSSIONE

Diverse patologie che colpiscono il settore dell'avicoltura sono caratterizzate da uno stato sub-clinico difficilmente individuabile che comporta gravi perdite nelle performance produttive. Tali stati sub-clinici sono spesso correlati a stati infiammatori e a risposte immunitarie non propriamente regolate. La modulazione della risposta infiammatoria è diventata uno degli strumenti più promettenti per migliorare lo stato di salute generale dell'animale, garantendo una risposta immunitaria mirata e migliore contro eventuali patogeni. Le molecole vegetali sono note per le loro proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie. Infatti, queste possono essere utilizzate come additivi per agire direttamente contro i patogeni o per regolare il sistema immunitario dell'animale.

In questo studio si è voluto studiare l'effetto di un estratto di semi di uva ricco in polifenoli e un composto naturale-identico puro, il timolo, che rappresenta uno dei componenti principali degli oli essenziali di timo e origano [15]. Si è deciso di partire da questi due tipi di molecole per via dei loro noti effetti antinfiammatori e immunoregolatori precedentemente verificati su altre linee cellulari dal nostro gruppo di ricerca (dati non pubblicati). Gli effetti di tali molecole vegetali, sulle cellule dendritiche, sono stati confrontati con quelli determinati da un corticosteroide, il desametasone, che agisce sul pathway Nf-Kb [16] e un antibiotico ad azione diretta contro i lipopolisaccaridi batterici, la colistina. La colistina è un antibiotico appartenente alla classe delle polimixine il cui meccanismo d'azione è volto al danneggiare la struttura tridimensionale dell'LPS [17].

Il trattamento con desametasone è risultato molto efficace nel bloccare l'azione dell'LPS, prevenendo la maturazione delle cellule dendritiche di pollo, spingendole verso un fenotipo tollerogenico e inibendo quasi totalmente la secrezione di citochine e l'espressione di tutte le molecole co-stimolatorie. Come ulteriore controllo, è stato anche testato l'effetto della colistina. L'azione della colistina sull'LPS non è risultata sufficiente però a bloccare completamente la maturazione delle imDC. Infatti viene comunque stimolata fortemente la produzione di CD83, MHC-II e Interferon-gamma. Questo effetto di inibizione parziale è già stato studiato da Tynan et al., (2012) [18]. Nel loro lavoro, infatti, viene riportato come le polimixine non siano pienamente in grado di inibire l'azione dell'LPS su cellule dendritiche murine [18]. Inoltre, Valentini e colleghi (2004), analizzando l'effetto della polimixina B sulla maturazione di cellule dendritiche umane, riportano che le polimixine sono in grado di indurre nelle cellule dendritiche modificazioni fenotipiche e strutturali riconducibili ad un processo di maturazione [19].

Le molecole vegetali da noi testate hanno ridotto in maniera significativa la produzione di citochine e i livelli di espressione di molecole co-stimolatorie, indicando un promettente effetto immunosoppressivo. Le imDC infatti tipicamente hanno bassi livelli di molecole co-stimolatorie CD83 e CD86 mentre hanno moderati livelli di MHC-II [20]. Quando le mDC vengono stimulate con LPS, e attivate a produrre una risposta infiammatoria, queste maturano esprimendo elevati livelli di CD40, CD83 e CD86 e hanno una forte produzione di citochine pro-infiammatorie [21]. La minor espressione di CD86 viene collegata ad una ridotta capacità delle DC di attivare i linfociti T durante un evento infiammatorio [22], rendendo quindi le molecole testate ancor più promettenti [9]. La riduzione di espressione del CD86 è correlata ad un fenotipo tollerogenico delle DC [9] quindi immunotollerante. Timolo e polifenoli sono caratterizzati da una spiccata azione antinfiammatoria, infatti il timolo 10ppm ha parzialmente ridotto l'espressione di CD86 nelle cellule stimulate con LPS, indicando comunque una parziale differenziazione ad un fenotipo tollerante. Inoltre, il timolo ha avuto un effetto meno forte sull'inibizione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie se comparato con desametasone ed ESU. I polifenoli contenuti nell'estratto d'uva, invece, hanno ridotto in maniera statisticamente significativa l'espressione dei marker associati alla maturazione, inducendo quindi un fenotipo tollerogenico.

È interessante quindi sottolineare che, rispetto alla colistina, che ha avuto un effetto parziale sulla componente immunitaria, timolo e ESU si sono rivelati molto efficaci come immuno-modulatori. Questo mette in luce le peculiarità delle molecole vege-

tali di essere in grado di svolgere sia un'azione antimicrobica che antinfiammatoria. Inoltre, tali molecole si sono anche rivelate antinfiammatori efficaci in maniera sovrapponibile a quanto visto con l'utilizzo del desametasone.

Studi futuri prevederanno studi approfonditi sul meccanismo d'azione di diverse molecole vegetali nel processo di maturazione delle imDC dal punto di vista della fagocitosi, della secrezione di citochine e della presenza di molecole co-stimolatorie sulla superficie cellulare.

CONCLUSIONI

In questo studio sono state poste le basi per l'analisi di effetti immunoregolatori di molecole vegetali su cellule dendritiche di pollo derivate dal midollo osseo. È stato messo a punto un protocollo per la generazione di cellule dendritiche aviarie immature partendo dai precursori ematopoietici contenuti nel midollo osseo. Queste sono state indotte alla maturazione tramite stimolazione con LPS ed è stato studiato l'effetto inibitorio di alcune molecole su questo processo. Lo studio ha mostrato promettenti risultati per l'impiego di molecole vegetali come immunomodulatori della risposta infiammatoria generata da cellule dendritiche nel pollo.

BIBLIOGRAFIA

1. Kurokawa K, Ishii T, An W, Kanazawa Y, Ozawa M, Ichianagi T, et al. A Heat-Stable Extract From *Mucuna* Stimulates the Differentiation of Bone Marrow Cells Into Dendritic Cells and Induces Apoptosis in Cancer Cells. *Nutr Cancer*. Routledge; 2011;63:100–8.
2. An W-W, Kanazawa Y, Ozawa M, Nakaya K, Saito T, Tanaka A, et al. Dendritic Cell Differentiation and Tumor Cell Apoptosis Induced by Components of a Poly-phenylpropanoid Polysaccharide Complex. *Anticancer Res. International Institute of Anticancer Research*; 2010;30:613–22.
3. Nakaya K, Nabata Y, Ichianagi T, An WW. Stimulation of Dendritic Cell Maturation and Induction of Apoptosis in Leukemia Cells by a Heat-stable Extract from Azuki bean (*Vigna angularis*), a Promising Immunopotentiating Food and Dietary Supplement for Cancer Prevention. *Asian Pac J Cancer Prev. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 2012;13:607–11.
4. Abreu DLC, Santos FF, José DS, Tortelly R, Nascimento ER, Pereira VLA. Pathological Aspects of a Subclinical Marek's Disease Case in Free-Range Chickens. *Braz J Poult Sci. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*; 2016;18:197–200.
5. Homer BL, Butcher GD, Miles RD, Rossi AF. Subclinical infectious bursal disease in an integrated broiler production operation. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 1992;4:406–11.
6. McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW, Todd D. Economic Effects of Subclinical Chicken Anemia Agent Infection in Broiler Chickens. *Avian Dis. [American Association of Avian Pathologists, Allen Press]*; 1991;35:263–8.
7. Posch W, Lass-Flörl C, Wilflingseder D. Generation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells from Whole Blood. *J Vis Exp JoVE.* 2016;
8. Xia D, Lou W, Fung K-M, Wolley CL, Suhail MM, Lin H-K. Cancer Chemopreventive Effects of *Boswellia sacra* Gum Resin Hydrodistillates on Invasive Urothelial Cell Carcinoma: Report of a Case. *Integr Cancer Ther. SAGE*

- Publications Inc STM; 2017;16:605–11.
9. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *J Immunol. American Association of Immunologists*; 2004;172:2778–84.
 10. Aldahlawi AM, Alzahrani AT, Elshal MF. Evaluation of immunomodulatory effects of *Boswellia sacra* essential oil on T-cells and dendritic cells. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20:352.
 11. Aldahlawi AM. Modulation of dendritic cell immune functions by plant components. *J Microsc Ultrastruct.* 2016;4:55–62.
 12. Miller AK, Benson JM, Muanza DN, Smith JR, Shepherd DM. Anti-inflammatory effects of natural product formulations on murine dendritic cells. *J Diet Suppl.* 2011;8:19–33.
 13. Amirghofran Z, Ahmadi H, Karimi MH. Immunomodulatory activity of the water extract of *Thymus vulgaris*, *Thymus daenensis*, AND *Zataria multiflora* on dendritic cells and T cells responses. *J Immunoassay Immunochem. Taylor & Francis*; 2012;33:388–402.
 14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods San Diego Calif.* 2001;25:402–8.
 15. Rossi B, Toschi A, Piva A, Grilli E. Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutr Res Rev.* 2020;1–17.
 16. Masić R, Dietz AB, Vuk-Pavlović S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66:909–14.
 17. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020;8:1716.
 18. Tynan GA, McNaughton A, Jarnicki A, Tsuji T, Lavelle EC. Polymyxin B Inadequately Quenches the Effects of Contaminating Lipopolysaccharide on Murine Dendritic Cells. *PLOS ONE. Public Library of Science*; 2012;7:e37261.
 19. Valentinis B, Bianchi A, Zhou D, Cipponi A, Catalanotti F, Russo V, et al. Direct Effects of Polymyxin B on Human Dendritic Cells Maturation. *J Biol Chem.* 2005;280:14264–71.
 20. Wu Z, Rothwell L, Young JR, Kaufman J, Butter C, Kaiser P. Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology.* 2010;129:133–45.
 21. Tze LE, Horikawa K, Domaschensch H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med.* 2011;208:149–65.
 22. Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Stelz G, Kuhnt C, Schuler G, et al. Mature Dendritic Cells Infected with Herpes Simplex Virus Type 1 Exhibit Inhibited T-Cell Stimulatory Capacity. *J Virol. American Society for Microbiology*; 2000;74:7127–36.



SIMULAZIONE *IN VITRO* DELL'EFFETTO DELLA DILUIZIONE IN ACQUA CLORATA DI VAC-SAFE SULLA VITALITÀ DI VACCINI VIVI AVIARI

Russo E.¹, Quaglia G.², Catelli E.², Lupini C.²

¹*MSD Animal Health, Strada di Olgia Vecchia Snc, Centro Direzionali Milano 2, Palazzo Canova, 20054, Segrate (MI), Italy;*

²*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie Alma Mater Studiorum Università di Bologna, via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italy.*

Summary

One of the most important points in vaccine administration *per os* is water quality. Many substances commonly present in tap water can inactivate vaccines, and the most important one is chlorine. Some products have been developed to inactivate chlorine if dissolved in water 10 minutes before the vaccine. The diffusion of dosing pump instead of tanks for the preparation of medicated water changed the procedure for the use of these products, in tanks they are mixed with water, 10 minutes after vaccine is added and medicated water is administered, with dosing pump there is a stock solution highly concentrated of vaccine and these products, that is mixed with chlorinated water. The aim of this study was to create the same condition in the lab to see if this change of procedure can affect the livability of Infectious Bronchitis (IB) live attenuated vaccine. The same batch of IB vaccine was titrated after dilution in distilled water, in the chlorine inactivator at high concentration and after dilution with the chlorine inactivator at high concentration with consequent addition of chlorinated water. The chlorine inactivator has no detrimental effect on IB vaccine, also at high concentration.

This result suggests the use of chlorine inactivator in stock solution for IB vaccine administration with dosing pump in tap water could be an effective route of administration. Future collection of field data can be useful to confirm what happened in the lab.

INTRODUZIONE

In ambito aviario la vaccinazione con vaccini vivi attenuati somministrati in acqua di abbeverata è una pratica molto comune, e nel corso degli anni sono stati sviluppati numerosi vaccini che possono essere impiegati attraverso questa via di somministrazione. Uno dei punti chiave per una buona vaccinazione è la modalità di preparazione della soluzione vaccinale. A questo riguardo la qualità dell'acqua è un elemento essenziale per garantire una corretta vaccinazione, vanno valutati il pH e la presenza di sostanze in grado di inattivare i vaccini, prima fra tutte il cloro, sempre presente nell'acqua di acquedotto ad una concentrazione variabile. Il vaccino vivo attenuato per la Bronchite Infettiva (IB) in particolare risulta essere molto sensibile al cloro (1). Parallelamente alla diffusione dell'uso di acqua di acquedotto, dal punto di vista sanitario più sicura di quella di pozzo, sono stati messi a punto prodotti in grado di migliorare la qualità dell'acqua: portando il pH alla neutralità, inattivando il cloro e chelando alcuni metalli pesanti. Tali prodotti vanno sciolti nell'acqua e lasciati agire

una decina di minuti prima di aggiungere il vaccino, ed hanno lo scopo di preservarne la vitalità.

Nei vecchi sistemi zootecnici che prevedevano la preparazione dell'acqua medicata in grosse vasche collocate all'inizio dell'impianto idrico di ogni capannone era facile sanificare l'acqua utilizzata per la vaccinazione. Oggi sempre più allevamenti hanno sostituito questo tipo di sistema con pompe dosatrici in grado di aspirare quantità stabilite di acqua medicata estremamente concentrata (soluzione madre), miscelandola all'acqua di acquedotto sino a raggiungere la concentrazione finale richiesta. Questo sistema rende notevolmente più semplice la preparazione di acqua medicata, ma nel caso della somministrazione del vaccino impedisce la sanificazione dell'acqua prima dell'aggiunta del vaccino. Con l'impiego della pompa dosatrice si rende necessario l'aggiunta di prodotti in grado di migliorare la qualità dell'acqua alla soluzione madre del vaccino. Il vaccino viene quindi esposto contemporaneamente ad una concentrazione estremamente elevata di queste sostanze e al cloro.

Lo scopo del presente lavoro è simulare *in vitro* su organocolture di anelli tracheali di embrione di pollo, l'effetto della diluizione in acqua clorata di un preparato del commercio in grado di inattivare il cloro (VAC-Safe®) sulla vitalità di un vaccino vivo attenuato per la bronchite infettiva aviare.

MATERIALI E METODI

Prodotti testati

Sono stati impiegati nella prova il vaccino vivo attenuato per la Bronchite Infettiva aviare Nobilis IB 4-91 (MSD Animal Health) e lo stabilizzante VAC-Safe® (MSD Animal Health).

Organocolture di anelli tracheali di embrioni di pollo Specific Pathogen Free (SPF)

Le colture di anelli tracheali di embrioni di pollo (TOC), sono state preparate da embrioni di pollo SPF a 18-20 giorni di incubazione, mediante asportazione della trachea e sezionamento della stessa in anelli di circa 0,5 mm di spessore. Le colture conservano, in opportune condizioni, movimento delle ciglia vibratili osservabile al microscopio rovesciato. Questo substrato è stato utilizzato per la titolazione del vaccino per Bronchite Infettiva aviare Nobilis IB 4-91, e per la verifica della tossicità del VAC-Safe® da solo o con il ceppo vaccinale.

Verifica della tossicità su TOC di VAC-Safe®

La tossicità del prodotto VAC-Safe® per le TOC, valutata sulla capacità di dare ciliostasi, è stata testata inoculando il prodotto alla diluizione 0.1 gr/L, in 20 TOC/diluizione. Dopo un'ora dall'inoculazione con VAC-Safe® il terreno è stato rimosso e sostituito con terreno vergine. La motilità ciliare è stata valutata mediante osservazione quotidiana per 7 giorni post-inoculazione. La prova, per ogni diluizione, è stata svolta in triplicato.

Titolazione del vaccino

Il titolo del vaccino Nobilis IB 4-91 utilizzato nel test, è stato ottenuto mediante inoculazione del vaccino in diluizioni seriali (da 10^{-5} a 10^0) su 5 TOC/diluizione. Quotidianamente, fino a 4 giorni post-inoculazione, è stata osservata e registrata

la presenza di eventuale ciliostasi. Il titolo, espresso dose infettante mediana per TOC (CID₅₀) è stato quindi calcolato, mediante il metodo di Reed e Muench (2).

Effetto del VAC-Safe® sul titolo vaccinale

Il virus vaccinale è stato messo a contatto con VAC-Safe® a diverse diluizioni (0.1 gr/L; 0.2 gr/L; 0.4 gr/L), quindi titolato su TOC come precedentemente descritto.

RISULTATI

VAC-Safe® non è risultato tossico per il substrato utilizzato (TOC) non essendo stata osservata ciliostasi a nessuna delle diluizioni del prodotto testate. Si è quindi proceduto con la successiva prova di valutazione dell'effetto della diluizione in acqua di VAC-Safe® sulla vitalità del vaccino in esame. Il titolo virale del vaccino su TOC è risultato pari a 10^{3.6}/ml CID₅₀ sia in assenza che in presenza di VAC-Safe® a diverse concentrazioni.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano che VAC-Safe® non ha attività inattivante il virus vaccinale Nobilis IB 4-91, anche a concentrazioni molto elevate (fino a 0.4 g/L). Questo dato sperimentale è di notevole importanza pratica poiché, assicurando il mantenimento di un adeguato titolo vaccinale in acqua da bere anche quando la distribuzione avviene con l'ausilio di pompe dosatrici, contribuisce a rendere la via di somministrazione in acqua da bere più corretta ed uniforme. Sarà importante estendere lo studio ad altri vaccini vivi attenuati impiegati in avicoltura e normalmente somministrati in acqua da bere quali il vaccino per bursite infettiva aviaria e quello per la Malattia di Newcastle.

BIBLIOGRAFIA

1. Jordan FT, Nassar TJ (1973). The survival of infectious bronchitis (IB) virus in water. *Avian Pathology* 2:2, 91-101.
2. Reed L.J. e Muench H., 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27: 493-497.



CONTRIBUTO DELLA VIA ALIMENTARE ALLA CIRCOLAZIONE DEL CEPPO PHY-LMV42 DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE IN RAPACI SELVATICI

Samarelli R.¹, Schiavone A.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Lombardi R.¹⁻², Siddique I.¹, Camarda A.¹⁻²

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

² *Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, Bitetto, Bari, Italy*

Summary

Newcastle Disease (ND), sustained by Avian Paramyxovirus-1 (APMV-1), has a high spreading capacity and a broad host spectrum that includes many species of wild birds which represent a natural reservoir both for pathogenic and vaccine strains.

Wildlife Rescue Centers can offer easy opportunities for viral exchange between individuals of different species, with potential consequences, both during the hospitalization phase and after the release into the wild.

A serological screening of hospitalized animals was carried out at the Osservatorio Faunistico Regionale (OFR), the Apulian Wildlife Rescue Center, as part of routine monitoring of infectious and diffusive diseases.

The survey involved 120 birds of different species and showed a serological positivity of 16.66% towards NDV, but the animals showed no clinical signs, suggesting the hypothesis of the circulation of a low pathogenic strain into the facilities of the center. In order to identify the common source of NDV infection, biomolecular tests were carried out on chicken meat usually administered as food to the animals of the OFR which showed, by RT-PCR, a positivity towards a strain of APMV-1. Phylogenetic investigations ascertained that it was the low virulence PHY-LMV42 strain, used for the preparation of a vaccine commonly employed in poultry farming systems in Italy and in many other countries, thus suggesting the involvement of the food route as a source of transmission of the NDV.

INTRODUZIONE

La Malattia di Newcastle (ND), o Pseudopeste aviare che è sostenuta dall'Avian Paramyxovirus-1 (APMV-1), è tra le malattie a maggior impatto per l'economia dell'industria avicola. Il suo agente eziologico, che si caratterizza per l'elevata capacità di diffusione tra i volatili, manifesta uno spettro d'ospite ampio, che comprende moltissime specie di uccelli selvatici, sia stanziali che migratori [1]. Questi volatili rappresentano una fonte importante di diffusione del virus nei diversi continenti, e di endemizzazione in aree più ristrette, da cui la malattia periodicamente riparte [2,3]. L'impiego oramai consolidato dei vaccini e l'adozione di misure di biosicurezza rigorose [4] hanno contribuito, nei paesi ad elevata vocazione avicola, a ridurre l'impatto esercitato dal virus negli allevamenti [5]. Esso, invece, ha continuato a propagarsi liberamente in ambiente selvatico [6].

Tra l'avifauna selvatica, oltre a ceppi dotati di potenzialità patogena [7] ne circolano molti di origine vaccinale [8], quali LaSota e Hitchner B1 [9], ma anche V4 e PHY-LMV42, isolati in particolare da columbiformi e anseriformi [10]. L'impatto reale di questa circolazione virale in ambiente selvatico non è ancora ben conosciuto. Tuttavia, nonostante i ceppi vaccinali siano stabili e poco inclini a fenomeni di mutazione e reversione, è noto che la comparsa di nuovi virus patogeni passa proprio attraverso mutazioni puntiformi in posizioni strategiche della proteina F, a partire da virus a bassa patogenicità [11], come accaduto in Australia negli anni 1998-2000 [12].

Oltre alla trasmissione orizzontale diretta, anche la via alimentare può rappresentare una fonte di trasmissione del virus, soprattutto per i rapaci di medie e grandi dimensioni, da falconeria e selvatici, che si alimentano abitualmente di specie serbatoio, tra i quali vi sono, ad esempio, anche colombi e tortore [13,14]. Ovviamente, nelle strutture dove vi è grande concentrazione e promiscuità di fauna selvatica, il rischio epidemiologico aumenta enormemente. I centri di recupero possono offrire facili occasioni di scambio di virus tra individui di specie diverse, i quali spesso, in condizioni immunitarie e di salute precarie, sono costretti a lunghe degenze in ambienti ristretti e spesso condivisi. In questi contesti il controllo della diffusione delle malattie infettive diviene, pertanto, un obiettivo centrale al fine di scongiurare impatti diretti e indiretti sugli animali, sia durante la fase di ricovero che successivamente, dopo il loro rilascio in natura.

Al fine di verificare l'eventuale circolazione del virus della Malattia di Newcastle è stato effettuato uno screening sierologico negli animali ricoverati presso il Centro Regionale di Recupero della Fauna Selvatica della Puglia. L'indagine è stata poi approfondita, al fine di verificare l'origine potenziale del contatto tra volatili e virus che potrebbe aver determinato la sieroconversione.

MATERIALI E METODI

Sono stati campionati 120 esemplari di avifauna selvatica ricoverati presso il Centro di Recupero della Fauna Selvatica annesso all'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia (OFR) e appartenenti a 29 specie di 7 diversi ordini (Tab.1): *Accipitriformes*, *Strigiformes*, *Anseriformes*, *Caradriformes*, *Procellariiformes*, *Podicipediformes*, *Pelecaniformes* *Ciconiiformes*.

Numero soggetti campionati	Specie	Nome latino
31	Poiana	<i>Buteo buteo</i>
18	Grillaio	<i>Falco naumanni</i>
5	Gheppio	<i>Falco tinnunculus</i>
4	Nibbio bruno	<i>Milvus migrans</i>
3	Falco Pecchiaiolo	<i>Pernis apivorus</i>
2	Biancone	<i>Circaetus gallicus</i>
2	Aquila Reale	<i>Aquila chrysaetos</i>
1	Falco di Palude	<i>Circus aeruginosus</i>
3	Sparviere	<i>Accipiter nisus</i>
1	Nibbio reale	<i>Milvus milvus</i>
1	Astore	<i>Accipiter gentilis</i>
4	Falco pellegrino	<i>Falco peregrinus</i>
1	Poiana codabianca	<i>Buteo rufinus</i>
1	Albanella minore	<i>Ciucus pygargus</i>
1	Grifone	<i>Gyps fulvus</i>
2	Civetta	<i>Athene noctua</i>
1	Falco sacro	<i>Falco cherrug</i>
1	Falco lanario	<i>Falco biarmicus</i>
5	Gufo reale	<i>Bubo bubo</i>
6	Barbagianni	<i>Tyto alba</i>
7	Gufo comune	<i>Asio otus</i>
13	Gabbiano reale	<i>Larus michahellis</i>
1	Gabbiano comune	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>
1	Berta minore	<i>Puffinus yelkouan</i>
1	Svasso maggiore	<i>Podiceps cristatus</i>
1	Airone guardabuoi	<i>Bubulcus ibis</i>
1	Tarabuso	<i>Botaurus stellaris</i>
1	Cigno	<i>Cygnus olor</i>
1	Germano reale	<i>Anas platyrhynchos</i>

Tabella 1. Numero e specie di volatili sottoposti a monitoraggio presso il centro di recupero.

I campionamenti sono stati effettuati nell'ambito del monitoraggio clinico svolto di routine sugli uccelli presenti nella struttura e indirizzato a verificare l'eventuale circolazione di malattie infettive e diffusive nel Centro di Recupero. La ricerca ha interessato, in particolare, esemplari con degenze prolungate ma che alla visita clinica risultavano apparentemente sani. Il sangue, prelevato dalla vena ulnare, è stato raccolto in provette da siero con attivatore e gel separatore, successivamente refrigerate e sottoposte a centrifugazione per 15 minuti a 1500 giri per favorire la separazione delle componenti ematiche. I sieri così ottenuti sono stati posti in provette Eppendorf e stoccati a -18 C° fino al momento dell'uso.

La ricerca degli anticorpi per la Pseudopeste aviaria è stata condotta mediante il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione utilizzando 4 unità emoagglutinanti di NDV, secondo le linee guida dell'allegato al DPR 92/66/CEE. L'antigene virale (ceppo di virus NDV Ulster 2c) e sieri, positivo e negativo di riferimento, sono stati forniti dal Centro di Referenza Nazionale per l'influenza aviaria e la Malattia di Newcastle presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Padova. Sono stati considerati positivi i soggetti con $-\log_2(\text{titolo}) > 3$.

Ricerca del Virus della Malattia di Newcastle

È stata effettuata mediante RT-PCR a partire da 35 colli di pollo destinati all'alimentazione dei rapaci, raccolti casualmente dalle scatole al momento dell'arrivo in Osservatorio.

In particolare, i campioni sono stati raggruppati in 7 pool da 5 colli ciascuno.

I colli erano forniti da un'azienda specializzata nella fornitura di mangimi per animali esotici, rapaci e non convenzionali.

La ricerca dell'RNA virale è stata effettuata a partire da tamponi RNAsi free, passati più volte sulla superficie dei colli dopo essere stati imbevuti in una soluzione fisiologica sterile. I tamponi sono stati riuniti in provetta in pool da 5.

L'estrazione di RNA è stata effettuata utilizzando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. L'amplificazione del frammento specifico di RNA virale è stata condotta mediante RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) utilizzando la metodica descritta da Stauber et al. [15].

Dai campioni risultati positivi, la banda sospetta è stata tagliata dal gel di agarosio ed è stata sottoposta ad eluizione utilizzando il kit PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen by life technologies) seguendo le indicazioni del fornitore.

Il prodotto è stato quindi sottoposto a clonaggio e successivamente sequenziato presso BMR Genomics s.r.l. (Padova, Italia).

Analisi delle sequenze

L'analisi nucleotidica e amminoacidica relativa alle sequenze ottenute è stata condotta con l'ausilio dell'applicazione CLC Sequence Viewer (CLC Bio, Aarhus, Danimarca).

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche sono state confrontate con quelle presenti in GenBank mediante software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). In particolare, sono stati usati gli algoritmi BlastN e BlastP per confrontare rispettivamente la sequenza nucleotidica e le sequenze amminoacidiche con quelle depositate in banca dati.

Analisi filogenetiche

La sequenza nucleotidica dell'amplicone relativa al caso in esame è stata confrontata con quella corrispondente relativa ad altri 53 stipiti virali depositati in GenBank. Il multiallineamento, allestito sulla base dell'algoritmo ClustalW, è stato elaborato mediante software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v 7. Sulla base del multiallineamento è stato allestito un albero filogenetico con metodo Neighbor-Joining, secondo il modello di Jukes-Cantor, ed effettuando il test di bootstrap su 1000 replicati. Lo stesso procedimento è stato utilizzato per l'analisi filogenetica relativa alla corrispondente sequenza amminoacidica, con la differenza che le distanze sono state calcolate secondo il modello Poisson.

Ethical Statement

Il progetto di ricerca è stato sottoposto e valutato dal comitato etico del Dipartimento di Medicina Veterinaria che ha espresso parere favorevole alla sua esecuzione. Approval number n. 20/2018

RISULTATI

Indagini sierologiche

In totale, 20 dei 120 volatili (16,66%) esaminati ha presentato un titolo uguale o superiore a 4 log₂, mentre altri 11 soggetti avevano un titolo pari a 3 log₂.

Tra gli acquatici solo un cigno reale, ospitato nel centro da molti anni come animale ornamentale, è risultato positivo; più alta la percentuale di soggetti con anticorpi tra i rapaci, sia diurni che, soprattutto, notturni (Tab.2).

	Campioni esaminati		Positivi	
		n		%
Rapaci Diurni	80	14		17,50
Rapaci Nottturni	20	5		25,00
Acquatici	20	1		5,00

Tabella 2. Distribuzione delle positività sierologiche a A-PMV1 tra i volatili sottoposti a monitoraggio.

I titoli riscontrati erano compresi tra 4 e 8 log₂, con una media di 5,5 ed una moda di 5. I titoli maggiori erano osservabili in un biancone, una poiana, nell'astore e nei gufi reali (Tab.3).

Specie	Soggetti esaminati	Titoli	
		n (titolo log ₂)	% di positività
Poiana	31	6 (4, 5, 5, 5,5,7)	19,35
Grillaio	18	2 (5,5)	11,11
Gheppio	11	1 (4)	9,00
Nibbio bruno	4	0	-
Nibbio reale	1	0	-
Falco pecchiaiolo	3	0	-
Falco lanario	1	0	-
Poiana codabianca	1	0	-
Grifone	1	0	-
Albanella minore	1	0	-
Biancone	2	1 (7)	50
Aquila Reale	2	1 (4)	50
Falco di Palude	1	1 (5)	100
Sparviere	3	0	-
Astore	1	1 (8)	100
Falco pellegrino	4	0	-
Falco sacro	1	1 (5)	100
Gufo reale	5	5 (4, 6, 7, 7, 8)	100
Barbagianni	6	0	-
Civetta	2	0	-
Gufo comune	7	0	-
Gabbiano reale	13	0	-
Gabbiano comune	1	0	-
Berta minore	1	0	-
Airone guardabuoi	1	0	-
Svasso maggiore	1	0	-
Tarabuso	1	0	-
Cigno	1	1 (5)	100
Germano reale	1	0	-

Tabella 3. Distribuzione delle positività sierologiche a A-PMV1 tra le diverse specie di fauna selvatica sottoposte a monitoraggio.

Esame virologico mediante RT-PCR da campioni di carne destinata all'alimentazione dei rapaci

Tutti i colli di pollo testati esibivano, all'elettroforesi dell'amplificato, la banda attesa di 310 pb (Fig.1).



Figura 1. Risultato della RT-PCR effettuata su campioni di colli di pollo per la ricerca del virus A-PMV1. A, B: colli di pollo; C: controllo positivo; M: Marker; D: controllo negativo.

Il successivo sequenziamento ha confermato la positività per APMV-1. All'amplificato virale è stata attribuita la sigla BA_2018.375.

La sequenza amminoacidica, estrapolata a partire dalla sequenza nucleotidica dopo confronto con le sequenze depositate in GenBank, dimostrava, per tutti e tre i campioni, un'elevata identità con una porzione polipeptidica della proteina di fusione del virus APMV-1.

Inoltre, poiché la sequenza dell'amplicone clonato, comprendeva il sito di clivaggio del precursore F0 della proteina di fusione è stato possibile accertare la patogenicità dei virus evidenziati. Nel caso di BA-2018.375, la sequenza del sito di clivaggio era ¹¹²GKQGR*L¹¹⁷ (l'asterisco indica il punto di taglio), tipica dei virus a bassa patogenicità. Il sito di clivaggio, inoltre era perfettamente corrispondente a quella del ceppo vaccinale PHY LMV42 [16] (Fig.2).

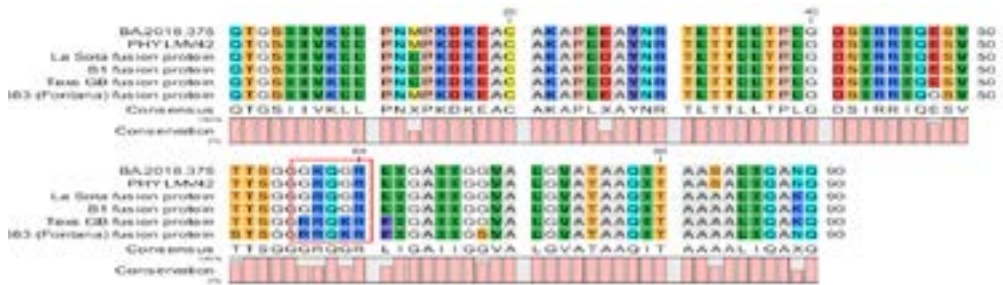


Figura 2. Allineamento del frammento amplificato relativo a BA-2018.375 con alcune sequenze di virus a bassa ed alta patogenicità presenti in GenBank.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle riportate in letteratura e depositate in GenBank. Per lo studio filogenetico, le sequenze amminoacidiche sono state multiallineate, e la distanza tra loro calcolata utilizzando la correzione di Poisson. L'albero filogenetico corrispondente è stato costruito utilizzando il metodo Neighbor Joining con test di bootstrap su 500 replicati. L'albero filogenetico ottenuto è mostrato in Fig. 3.

Il ceppo isolato BA-2018 risulta pienamente correlato al ceppo vaccinale PHY-L-MV42 (percentuale di identità del 100%).

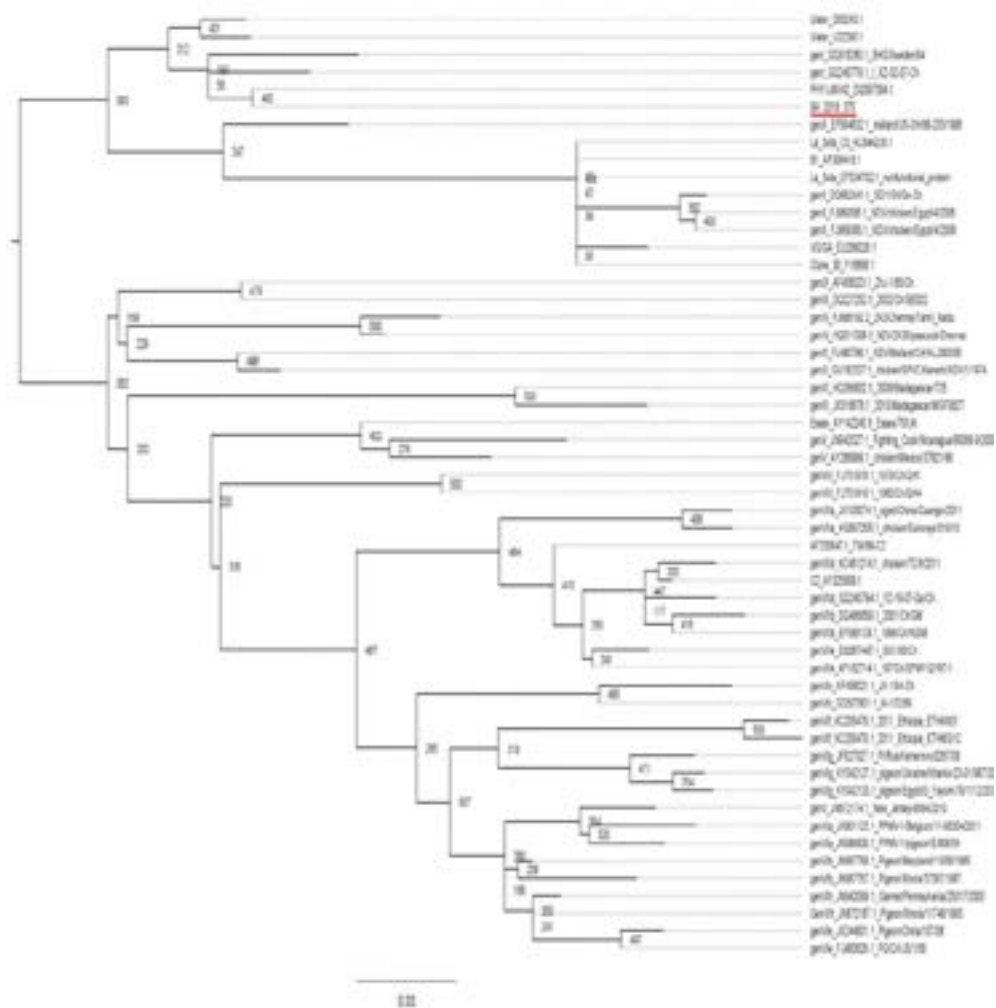


Figura 3. Albero filogenetico costruito sulla base del confronto delle sequenze aminoacidiche

DISCUSSIONE

Il monitoraggio sierologico effettuato su larga scala negli animali del Centro di Recupero ha evidenziato positività compatibili con una circolazione del virus della Pseudopeste aviare all'interno della struttura. L'assenza di sintomatologia, in ogni caso, ha portato a ipotizzare che l'infezione sia da attribuire a un ceppo a bassa patogenicità.

Gli uccelli che hanno manifestato sieroconversione erano quasi esclusivamente i rapaci, sia diurni che notturni. Gli acquatici, infatti, sono risultati costantemente negativi ad eccezione di un cigno lungodegente, che viveva da almeno dieci anni libero in un laghetto. In natura, gli anatidi mostrano una bassa prevalenza dell'infezione

[17], con percentuali di positività che variano dallo 0,5 al 2%. Essi sono considerati serbatoio per patotipi di APMV-1 a bassa virulenza o di ceppi apatogeni enterici. L'intestino di questi animali costituisce un perfetto ambiente per la ricombinazione virale che, in alcuni, casi può esitare con la comparsa di ceppi ad elevata patogenicità [18,19]. È possibile che il cigno abbia avuto contatti con altre specie libere in natura che utilizzano il laghetto per il passo e che da esse abbia potuto acquisire il virus che ha determinato la sierconversione.

Nella nostra indagine la maggior percentuale di positività era presente nei rapaci notturni e, tra questi, nel gufo reale. Tutti gli esemplari di questa specie presentavano anticorpi specifici nei confronti del virus. Questi volatili in cattività possono superare i 60 anni di vita, mentre allo stato selvatico si ritiene che questa aspettativa si posizioni sui 20 anni circa [20,21]. I gufi reali sottoposti a monitoraggio erano ricoverati da molti anni, alcuni da oltre 20. Durante la loro lunga vita questi uccelli hanno probabilmente maggiore probabilità di venire a contatto con i virus pseudo-pestosi e contrarre l'infezione. Il gufo reale sembrerebbe, inoltre, essere in grado di sierconvertire facilmente ma, allo stesso tempo, non sarebbe incline a manifestare la sintomatologia clinica. Esso può eliminare il virus fino a 4 mesi post-infezione [22]. Segnalazioni di soggetti con positività virologica sono state fatte in questa specie in passato [23,24], in Europa e a Taiwan [25].

I titoli riscontrati nel monitoraggio descritto in questo lavoro risultano, nel gufo, relativamente elevati a conferma di una infezione abbastanza recente. Vi è da segnalare tuttavia il fatto che in questa specie gli anticorpi neutralizzanti anti-APMV-1 possono essere rilevati in circolo fino ad un anno post-infezione [22].

Titoli simili a quelli del gufo reale sono stati riscontrati in un biancone e nelle poiiane lungodegenti, ricoverati da alcuni anni presso il Centro di Recupero. Alcune delle poiiane positive, inoltre, condividevano la stessa voliera. La circolazione dei virus pseudo-pestosi in natura è un fenomeno noto [7]. La fonte dell'infezione è spesso alimentare, e da ricondurre soprattutto al consumo di piccoli uccelli [26], i quali si pensa possano fungere da vettori meccanici dei virus vaccinali, specie quando vivono in prossimità di allevamenti avicoli intensivi. Per falchi di medie o grandi dimensioni una fonte importante di infezione può essere rappresentata dai colombi (*Columba livia*), dalle quaglie (*Coturnix japonica*) e, più raramente, dai polli infetti [27,28,29]. È per questo motivo che i virus presenti nei predatori sono spesso strettamente correlati con quelli che infettano le loro prede [24].

Nelle indagini effettuate, la percentuale media di positività riscontrata appariva più elevata rispetto a quella riscontrata in analoghe ricerche effettuate su soggetti liberi. A queste si aggiungevano numerosi campioni che presentavano un titolo di 3 log₂ che, sebbene considerato negativo nell'ambito di screening epidemiologici nel pollo, non esclude completamente contatti pregressi col virus. Queste osservazioni hanno portato ad approfondire le indagini al fine di verificare se la diffusa sierconversione, in assenza di sintomatologia clinica, fosse da associare a una fonte comune di infezione.

I test genetici effettuati hanno chiaramente individuato nei colli di pollo la fonte principale del virus. Tutti i campioni testati, infatti, sono risultati positivi in PCR nei confronti di un ceppo di APMV-1. Lo studio genetico del sito di clivaggio nelle posizioni comprese tra la 113 e 117 ha consentito, inoltre, di accertare che si trattava di un virus a bassa virulenza. Questo virus, pertanto, non può essere considerato un pericolo per la salute dei volatili ricoverati.

È noto che le condizioni di stress portano i Paramyxovirus, al pari degli Orthomyxovirus [30,31,32] a replicare con maggiore facilità nell'organismo. Questo può indurre, da un lato, una più significativa eliminazione del virus e dall'altro una maggiore probabilità che esso muti a livello del sito di clivaggio, con una inversione della patogenicità del ceppo. Si ipotizza, infatti, che sia stata proprio la sostituzione di uno o due aminoacidi nel sito di clivaggio a dare origine, in Australia e Irlanda, a ceppi patogeni ad elevata diffusione [33,34,35].

Bisogna inoltre considerare che, anche se a bassa virulenza, alcuni stipiti virali mantengono un potere patogeno residuo. Ne sono prova gli studi effettuati calcolando l'indice di patogenicità di ceppi vaccinali di pseudopeste aviaria utilizzati come vaccini che hanno accertato, ad esempio, che il ceppo Lasota, capostipite dei virus vaccinali della Pseudopeste, ha un ICPI pari a 0,4. Non può essere escluso, pertanto, che vaccini allestiti con ceppi che presentano una patogenicità residua possano facilitare l'insorgenza di infezioni secondarie soprattutto all'albero respiratorio [22] che possono condurre a morte gli animali.

Le indagini filogenetiche effettuate sulla porzione di gene della proteina F hanno consentito di accertare che il virus responsabile della sierconversione era di origine vaccinale. Si trattava, infatti, del ceppo PHY-LMV42, a bassa virulenza, naturalmente apatogeno, di tipo enterico, impiegato per l'allestimento di un vaccino vivo utilizzato in Italia e in molti paesi europei ed extraeuropei.

La vaccinazione con virus vivo attenuato è utilizzata di routine nell'industria avicola. I pulcini, infatti, vengono immunizzati già a un giorno di vita per via spray e poi, a volte, se ritenuto necessario, sottoposti ad un richiamo se destinati alla produzione di carne, o nel caso delle galline ovaiole anche a 2 richiami nella fase di pollastra.

Il virus potrebbe, pertanto, persistere nell'ambiente e negli animali, e questo potrebbe facilitare la contaminazione delle carcasse durante la macellazione. Il mantenimento della catena del freddo favorirebbe la sopravvivenza del virus [36]. I rapaci del centro di recupero si sarebbero infettati, pertanto, mangiando questi alimenti.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire se il virus possa effettivamente sopravvivere negli alimenti destinati ai rapaci per confermare il rapporto di causa effetto tra assunzione dell'alimento e sierconversione e verificare se gli uccelli, una volta infetti, eliminino il virus nell'ambiente innescando la catena epidemiologica di diffusione e trasmissione dello stesso. Ovviamente l'assoluta apatogenicità e stabilità del ceppo virale riscontrato nelle presenti indagini rende pressochè nullo il rischio per gli animali. Questi dati sono comunque importanti in quanto forniscono indicazioni, sia pure indirette, dell'importanza che l'alimentazione può avere nel facilitare la circolazione di virus in natura e nei centri di recupero tra le popolazioni di fauna selvatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaleta, E. F., & Baldauf, C. (1988). *Newcastle Disease in Free-Living and Pet Birds*, 197–246.
2. Alexander, D. J., Aldous, E. W., & Fuller, C. M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology* 41(4), 329–335.
3. Choi, K. S., Kye, S. J., Kim, J. Y., To, T. L., Nguyen, D. T., Lee, Y. J., Choi, J. G., Kang, H. M., Kim, K. Il, Song, B. M., & Lee, H. S. (2014). Molecular epide-

- miology of Newcastle disease viruses in Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 271–277.
4. Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453.
 5. Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 19(2), 443–462.
 6. Rahman, A., Habib, M., & Shabbir, M. Z. (2018). Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Feral Birds and their Potential Role in Interspecies Transmission. *The Open Virology Journal*, 12(1), 52–68.
 7. Suarez DL, Miller PJ, Koch G, Mundt E, Rautenschlein S (2019). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougals LR, Nair V, Suarez DL, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitno TY, Rubinoff I and Zavala G (Eds), *Diseases of Poultry 14th Edition*, John Wiley & Sons, Hoboken, US. pp. 109-166.
 8. Welch, C. N., Shittu, I., Abolnik, C., Solomon, P., Dimitrov, K. M., Taylor, T. L., Williams-Coplin, D., Goraichuk, I. V., Meseko, C. A., Ibu, J. O., Gado, D. A., Joannis, T. M., & Afonso, C. L. (2019). Genomic comparison of Newcastle disease viruses isolated in Nigeria between 2002 and 2015 reveals circulation of highly diverse genotypes and spillover into wild birds. *Archives of Virology*, 164(8), 2031–2047.
 9. Miguel, E., Grosbois, V., Berthouly-Salazar, C., Caron, A., Cappelle, J., & Roger, F. (2013). A meta-analysis of observational epidemiological studies of Newcastle disease in African agro-systems, 1980-2009. *Epidemiology and Infection*, 141(6), 1117–1133.
 10. Ayala, A. J., Dimitrov, K. M., Becker, C. R., Goraichuk, I. V., Arns, C. W., Bolotin, V. I., Ferreira, H. L., Gerilovych, A. P., Goujgoulouva, G. V., Martini, M. C., Muzyka, D. V., Orsi, M. A., Scagion, G. P., Silva, R. K., Solodiankin, O. S., Stegnyy, B. T., Miller, P. J., & Afonso, C. L. (2016). Presence of vaccine-derived newcastle disease viruses in wild birds. *PLOS ONE*, 11(9), 1–19.
 11. Rahmahani, J., Nikmatuz Zahro, A., Rahmawati, I. L., Putih, N., Wulandari, I., & Abdul-Rantam, F. (2020). Nucleotide mutation analyses of isolated lentogenic newcastle disease virus in live bird market. *Molecular Biology Research Communications*, 9(4), 181–188.
 12. Gould, A. R., Hansson, E., Selleck, K., Kattenbelt, J. A., Mackenzie, M., & Della-Porta, A. J. (2010). Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. *Avian Pathology*, 32(4), 361-373.
 13. Jindal, N., Chander, Y., Primus, A., Redig, P. T., & Goyal, S. M. (2010). Isolation and molecular characterization of Newcastle disease viruses from raptors. *Avian Pathology*, 39(6), 441–445.
 14. Francksen, R. M., Whittingham, M. J., Ludwig, S. C., Roos, S., & Baines, D. (2017). Numerical and functional responses of Common Buzzards (*Buteo buteo*) to prey abundance on a Scottish grouse moor. *Ibis*, 159(3), 541–553.
 15. Stäuber, N., Brechtbühl, K., Bruckner, L., Hofmann, M.A. (1995). Detection of

- Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine*, Vol.13, No.4, 360-364.
16. Czeplédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., & Lomniczi, B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120(1–2), 36–48.
 17. Wobeser, G.A. (1997). “Avian Influenza, Newcastle Disease, and Other Paramyxoviruses. In: G. A. Wobeser (Ed.), *Diseases of Wild Waterfowl* (2nd Edn, Pp. 29±41). New York: Plenum Press.” pag. 29-41.
 18. Lancaster, J.E. (1966). “Newcastle Disease,” 1926–64. Monograph No. 3. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Ontario. Cit. da Lancaster, J. E. (1981). Newcastle Disease—Pathogenesis and Diagnosis. *World's Poultry Science Journal*, 37(1), 26-33. doi:10.1079/WPS19810003
 19. Westbury, H. (2001). “Commentary. Newcastle Disease Virus: An Evolving Pathogen.” *Avian Pathology*, 5–11.
 20. König, C., Weick, F. (2008). “*Owls of the World (2nd ed)*”. London: Christopher Helm pag. 1-508.
 21. Mikkola, H. (2012). “*Owls of the World: A Photographic Guide*”. Firefly Books. Pag. 1-528
 22. Catelli, E. (2009). Infezioni da Paramyxoviridae. In G. Asdrubali & A. Fioretti (Eds.), *Manuale di Patologia Aviaria* pag. 137–153.
 23. Schoop, G., Siegert, R., Galassi, D. and Kloppel, G. (1955). “Newcastle-Infektionen Beim Steinkaug (Athene Noctua), Hornraben (Bucorvus Sp.), Seeadler (Haliaeetus Albicilla) Und Rieseneisvogel (Dacelo Gigas).” *Monatshefte Für Tierheilkunde Stuttgart* 7, 223-235.
 24. Jindal, Naresh, Yogesh Chander, Alexander Primus, Patrick T Redig, and Sagar M Goyal. (2010). “Isolation and Molecular Characterization of Newcastle Disease Viruses from Raptors.” *Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A* 39 (6): 441–45.
 25. Kou, Y.T., Chueh, L.L. & Wang, C.H. (1999). “Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the F Gene of Newcastle Disease Viruses Isolated from Chickens and an Owl in Taiwan.” *Journal of Veterinary and Medical Science* 61, Iss. 11, 1-5.
 26. Stalmaster, M.V. (1987). “The Bald Eagle.” *New York: Universe Co., Publishing*; pag. 1-10.
 27. Samour J. (2005). “Management of Raptors. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, Eds. *Clinical Avian Medicine. Vol II. Lake Worth, FL: Spix Publishing; 2005:915–956.*”
 28. Stanford M. (2008). “Raptors: Infectious Diseases. In: Chitty J, Lierz M, Eds. *BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Passerine Birds. Quedgeley, UK: British Small Animal Veterinary Association;*” pag 212-222
 29. Wernery U, Alexander DJ, Neumann U, et al. (1995). “Newcastle Disease in Captive Falcons.” In *Proc Middle East Falcon Res Group Spec Workshop*, 24–39.
 30. De Marco, M. A., Campitelli, L., Foni, E., Raffini, E., Barigazzi, G., Delogu, M., Guberti, V., Di Trani, L., Tollis, M., & Donatelli, L. (2004). Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992–1998): is there a host restricted circula-

- tion of influenza viruses in sympatric ducks and coots? *Veterinary Microbiology*, 98(3–4), 197–208.
31. De Marco, M. A., Foni, G. E., Campitelli, L., Raffini, E., Di Trani, L., Delogu, M., Guberti, V., Barigazzi, G., & Donatelli, I. (2003). Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases*, 47(3), 861–866.
 32. Delogu, M. (2009). Infezioni da Orthomyxovirus. In G. Asdrubali & A. Fioretti (Eds.), *Manuale di Patologia Aviaria* pag. 155–173.
 33. Alexander, D. J. (1997). Newcastle Disease and Other Paramyxoviridae Infections. In S. K. Samal (Ed.), *Disease of Poultry* 10th ed., pag 541–569.
 34. Collins, M. S., Franklin, S., Strong, I., Meulemans, G., & Alexander, D. J. (1998). Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 27(1), 90–96.
 35. Gould, A. R., Kattenbelt, J. A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, A., & Westbury, H. A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Research*, 77(1), 51–60.
 36. OIE. Newcastle disease (avian paramyxovirus serotype 1). Aetiology, epidemiology, diagnosis, prevention and control. Potential impacts of disease agent beyond clinical illness references. <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/newcastle-disease-virus-wild-birdsinfection-with.pdf>. Ultimo accesso 23.09.2021.

PROFILI FENOTIPICI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI *ESCHERICHIA COLI* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATI DA VOLATILI PET

Dipineto L., Varriale L., Russo T.P., Santaniello A., Borrelli L., Minichino A., Pace A., Menna L.F., Fioretti A.

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

Summary

Antibiotic resistance is one of the biggest public health challenges of our time. Several studies have been conducted on livestock showing a correlation between the systemic use of antibiotics and the onset of resistant bacterial strains. In contrast, although companion birds are historically considered as an important reservoir for human health threats, little information on the antimicrobial resistance in these species is available in the literature. Therefore, this study was aimed at evaluating the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from 755 companion birds. Cloacal samples were collected for *E. coli* and *P. aeruginosa* isolation and all isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing. *P. aeruginosa* was isolated in 59/755 (7.8%) samples, whereas *E. coli* was isolated in 236/755 (31.3%) samples. Most strains showed multidrug resistance. This study highlights that companion birds may act as potential reservoirs carrying antimicrobial resistance genes which could transfer directly or indirectly to humans and animals, and from a One Health perspective this risk should not be underestimated.

INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza (AMR) è un fenomeno naturale che compromette il trattamento empirico delle infezioni e si traduce in una mancanza dell'efficacia degli antibiotici e in un aumento delle spese mediche [1]. La comparsa di batteri resistenti è un problema globale che sta mettendo in pericolo l'efficacia degli antibiotici che hanno trasformato la medicina e salvato milioni di vite. La crisi legata alla AMR è stata attribuita al cattivo uso e all'abuso di questi farmaci, nonché alla mancanza di sviluppo di nuovi farmaci da parte dell'industria farmaceutica a causa di incentivi economici ridotti e requisiti normativi farraginosi [2]. Sono stati condotti diversi studi sugli animali da reddito che mostrano una stretta correlazione tra l'uso sistemico di antibiotici e l'insorgenza di ceppi batterici resistenti [3]. Al contrario, sebbene gli uccelli selvatici siano storicamente considerati un eccellente reservoir animale, in letteratura sono disponibili scarse informazioni sulla AMR negli uccelli da compagnia [4]. Questo topic, infatti, è stato ampiamente studiato negli uccelli selvatici, in particolare nei rapaci, negli uccelli acquatici e nei passeriformi, evidenziandone il ruolo come serbatoio di ceppi batterici multiresistenti e sottolineandone il rischio per la salute umana e animale [5]. Alla luce di tali considerazioni, il presente studio è stato intrapreso con lo scopo di valutare la resistenza antimicrobica di *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* isolati da uccelli da compagnia al fine di comprendere meglio il ruolo epidemiologico di queste specie nella diffusione di batteri multiresistenti tra animali, uomo e ambiente.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Durante il periodo Gennaio 2016-Dicembre 2018, sono stati esaminati 735 uccelli da compagnia clinicamente sani su ciascun dei quali veniva effettuato un tampone cloacale. I volatili appartenevano alle seguenti famiglie e specie: Fringillidae (*Carduelis carduelis*, *Serinus canaria*), Estrildidae (*Erythrura gouldiae*, *Lonchura striata domestica*, *Taeniopygia guttata*), Psittacidae (*Melopsittacus undulatus*, *Agapornis roseicollis*) e Columbidae (*Columba livia domestica*). Tutti gli uccelli esaminati erano selezionati da differenti allevamenti della regione Campania. Come affermato dai rispettivi proprietari, gli animali non ricevevano alcun trattamento antibiotico al momento del campionamento e nei precedenti tre mesi. Ogni campione veniva conservato in terreno di trasporto a +4 °C, inviato al laboratorio e analizzato entro 2 ore dal prelievo.

Isolamento e identificazione dei batteri

I tamponi cloacali venivano inoculati in Buffered-Peptone Water (BPW, Oxoid, Milano) e incubati a 37 °C per 24 ore. Le colture venivano seminate su MacConkey agar e Cetrimide agar (Oxoid, Milan), e incubate a +37 °C per 24 ore. Le colonie “sospette” di *E. coli* venivano seminate su Tryptone Bile X-Glucuronide e incubate a +42 °C per 24 ore. Tutti gli isolati venivano identificati biochimicamente mediante il sistema miniaturizzato API 20E (BioMérieux, Marcy l’Etoile, France); le colonie “sospette” di *Pseudomonas* spp., invece, venivano sottoposte al test dell’ossidasi e processate biochimicamente attraverso il sistema API 20 NE (BioMérieux).

Antibiogramma

Su tutti gli isolati si eseguiva un antibiogramma mediante la metodica di Kirby-Bauer secondo le linee guida del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2012) [6]. Gli antibiotici testati erano rappresentati da amoxicillina/acido clavulanico (AMC; 30 µg), sulfametossazolo-trimethoprim (SXT; 25 µg), doxiciclina (DO; 30 µg), enrofloxacin (ENR; 5 µg), gentamicina (CN; 10 µg), e ossitetraciclina (OT; 30 µg). *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC15442 venivano usati come controllo positivo in ogni test. Gli aloni di inibizione venivano misurati seguendo i documenti CLSI (CLSI, 2014) [7].

RISULTATI

I risultati ottenuti hanno evidenziato la positività a *P. aeruginosa* in 59/755 (7,8%, 95% intervallo di confidenza = 6,05–10,02%) campioni e a *E. coli* in 236/755 (31,3%, 95% CI = 28–34,7%) campioni. Inoltre, sono stati isolati occasionalmente anche alcuni batteri Gram-negativi come *Pantoea* spp., *Serratia* spp, *Morganella* spp., e *Citrobacter* spp. In merito all’antibiogramma, 45/59 (76,3%) ceppi di *P. aeruginosa* sono risultati resistenti a amoxicicillina/acido clavulanico (AMC; 30 µg) e a sulfametossazolo-trimethoprim (SXT; 25 µg), 42/59 (71,2%) alla doxiciclina (DO; 30 µg), 46/59 (78%) alla enrofloxacin (ENR; 5 µg), 17/59 (28,9%) alla gentamicina (CN; 10 µg) e 48/59 (81,3%) all’ossitetraciclina (OT; 30 µg). Tra i ceppi di *E. coli* isolati, 118/231 (51,1%) sono risultati resistenti alla amoxicicillina/acido clavulanico (AMC; 30 µg), 127/231 (55%) a sulfametossazolo-tri-

methoprim (SXT; 25 µg), 132/231 (57,1%) alla doxiciolina (DO; 30 µg), 92/231 (40%) alla enrofloxacina (ENR; 5 µg), 61/231 (26,4%) alla gentamicina (CN; 10 µg), 147/231 (63,6%) all'ossitetraciclina (OT; 30 µg). La maggior parte dei ceppi mostrava fenomeni di multiresistenza. I risultati ottenuti sono sintetizzati in tabella 1 e tabella 2.

Tabella 1. Prevalenza di *P. aeruginosa* e percentuale di AMR nei volatili esaminati.

Volatili esaminati (numero)	Sigla Antibiotici testati Numero di campioni positivi (%)					
	AMC30 ¹	SXT25 ²	DO30 ³	ENR5 ⁴	CN10 ⁵	OT30 ⁶
Fringillidae (388)	38/45 (84,4)	37/45 (82,2)	37/45 (82,2)	40/45 (88,8)	14/45 (31,1)	39/45 (86,6)
Estrildidae (52)	4/5 (80,0)	4/5 (80,3)	1/5 (20,0)	1/5 (20,0)	0/5 (0,0)	4/5 (80,0)
Psittacidae (77)	0/3 (0,0)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	2/3 (66,7)	2/3 (66,7)	2/3 (66,7)
Columbidae (238)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)	6/6 (100)

¹Amoxicillina/Acido Clavulanico; ²Trimethoprim/Sulfametossazolo; ³Doxiciclina; ⁴Enrofloxacina; ⁵Gentamicina; ⁶Ossitetraciclina.

Tabella 2. Prevalenza di *E. coli* e percentuale di AMR nei volatili esaminati.

Volatili esaminati (numero)	Sigla Antibiotici testati Numero di campioni positivi (%)					
	AMC30 ¹	SXT25 ²	DO30 ³	ENR5 ⁴	CN10 ⁵	OT30 ⁶
Fringillidae (388)	24/33 (72,7)	13/33 (39,4)	15/33 (45,4)	18/33 (54,5)	12/33 (36,4)	18/33 (54,5)
Estrildidae (52)	5/13 (38,5)	4/13 (30,8)	4/13 (30,8)	4/13 (30,8)	2/13 (15,4)	6/13 (46,1)
Psittacidae (77)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	7/8 (87,5)	8/8 (100)	3/8 (37,5)	7/8 (87,5)
Columbidae (238)	82/182 (47,5)	102/182 (61,7)	106/182 (65,4)	62/182 (38,3)	44/182 (25,9)	116/182 (70,4)

¹Amoxicillina/Acido Clavulanico; ²Trimethoprim/Sulfametossazolo; ³Doxiciclina; ⁴Enrofloxacina; ⁵Gentamicina; ⁶Ossitetraciclina.

DISCUSSIONE

In questo studio, *E. coli* e *P. aeruginosa* sono risultati i batteri maggiormente isolati dagli uccelli da compagnia con una prevalenza rispettivamente del 30,7% e del 7,8%. *E. coli* è una delle specie batteriche più patogene negli uccelli da gabbia dove causa aerosacculite, polisierosite, setticemia e altre malattie principalmente extraintestinali [8]. *P. aeruginosa* è, invece, ubiquitario nelle voliere e, in condizioni favorevoli, può agire come patogeno opportunista. Può manifestarsi con infezioni localizzate come riniti, sinusiti e laringiti o può essere associato a setticemia ed enterite emorragica. La AMR dei batteri Gram-negativi è stata ampiamente riportata nella medicina aviaria, specialmente nel pollame; tuttavia, i dati disponibili negli uccelli da compagnia sono molto scarsi. I nostri risultati

sono coerenti con quelli riportati da Sigirci et al. [9] che ha isolato *E. coli* dal 37,7% degli uccelli da compagnia esaminati, con la maggior parte degli isolati resistenti alla tetraciclina (84%) seguita da sulfametossazolo/trimetoprim (46%), streptomina (34%) e kanamicina (25%). I fenotipi multiresistenti si riscontrano frequentemente in *P. aeruginosa* causando infezioni nosocomiali nell'uomo. Questo patogeno opportunisto è considerato "critico" e l'identificazione di nuovi antibiotici è essenziale per superare le sue proprietà di multiresistenza [10]. Per nostra conoscenza, non sono disponibili dati sui profili AMR di questo microrganismo negli uccelli da compagnia, sebbene la possibilità di trasmettere infezioni e geni di resistenza ad altre specie, compreso l'uomo, sia un problema di salute pubblica che dovrebbe richiedere maggiore attenzione. I nostri risultati mostrano che il 7,8% degli uccelli esaminati era positivo a *P. aeruginosa*, con tutti i ceppi resistenti ad almeno un antibiotico, la maggior parte dei quali mostrava multiresistenza con tassi fino al 100%.

Il nostro studio, pur mostrando una caratteristica innovativa per le specie aviarie considerate, presenta alcuni limiti, come una grande differenza nel numero di specie aviarie campionate e una mancanza di caratterizzazione molecolare dei geni di resistenza. Ciononostante, i nostri risultati evidenziano il ruolo degli uccelli da compagnia come potenziali vettori e serbatoi nella diffusione e trasmissione dell'AMR e sottolineano l'importanza dei programmi di sorveglianza per prevenire l'impatto di questa minaccia sulla salute pubblica [11]. Vorremmo anche incoraggiare ulteriori studi più approfonditi in questo campo per caratterizzare i profili plasmidici eventualmente associati ai fenotipi multiresistenti. Infatti, identificare i meccanismi specifici che sono alla base della resistenza antimicrobica, in queste specie, potrebbe fornire ulteriori informazioni sul loro ruolo nell'interfaccia animale-uomo-ecosistema. Sarebbe, infine, auspicabile un approccio One Health con la collaborazione tra medici veterinari, medici, professionisti della sanità pubblica ed epidemiologi al fine di garantire una più efficace e condivisa strategia per la sfida globale all'AMR che attualmente colpisce l'uomo, gli animali e l'ecosistema in modo trasversale.

BIBLIOGRAFIA

1. Founou RC, Founou LL and SY Essack. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 12:e0189621.
2. de Kraker MEA, Stewardson AJ and S Harbarth. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Med.* 13:e1002184.
3. WHO. (2017). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Available online: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.
4. Dipineto L, Borrelli L, Pace A, Romano V, D'Orazio S, Varriale L, Russo TP and A Fioretti. (2017). *Campylobacter coli* infection in pet birds in southern Italy. *Acta Vet. Scand.* 59:6.
5. Benskin CM, Wilson K, Jones K and IR Hartley. (2009). Bacterial pathogens in wild birds: A review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 84:349–373.

6. CLSI. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 7th ed.; Approved Standard M02-A11; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
7. CLSI. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 24th ed.; Approved Standard M100-S24; Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
8. Dho-Moulin M and JM, Fairbrother. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299–316.
9. Sigirci BD, Celik B, Halac B, Adiguzel MC, Kekec I, et al. (2020). Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from companion birds. *J. King Saud Univ. Sci.* 32:1069–1073.
10. Pragasam AK, Veeraraghavan B, Nalini E, Anandan S and KS Kaye. (2018). An update on antimicrobial resistance and the role of newer antimicrobial agents for *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J. Med. Microbiol.* 36:303–316.
11. Berendonk TU, Manaia CM, Merlin M, Fatta-Kassinos D, et al. (2015). Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:310–317.



DERMANYSSUS GALLINAE TRASMETTE VERTICALMENTE SALMONELLA GALLINARUM: PRIMA DIMOSTRAZIONE IN VITRO

Schiavone A., Pugliese N., Samarelli R., Circella E., D'Amico F., Camarda A.

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

Summary

This study is aimed to evaluate the vertical transmission of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) ser. Gallinarum, the etiological agent of Fowl Typhoid (FT), by *Dermanyssus gallinae*. The investigation was carried out on mite samples fed *in vitro* on blood artificially infected with *S. Gallinarum*, by adopting feeding devices constructed with a Baudruche membrane. The engorged mites were incubated individually for 72 and 120 hours. The DNA was extracted from eggs and pools of adults and larvae, after 72 hours, and from pools of protonymphs, after 120 hours. A real time PCR was performed to assess and quantify *S. Gallinarum* in mites. All adults, 7,7% of eggs, 12,5% of larvae and 66,7% of protonymphs were positive to *S. Gallinarum*. The pathogen average load was variable in adults, ranging from 3.8 to 5131.7 cells/pool. It was 35.65 in eggs, 45.5 in larvae and 1449 in protonymphs. The results proved for the first time the vertical transmission of *S. Gallinarum* by *D. gallinae*, at least from adults to protonymphs, thus highlighting how a good prophylaxis strategy for FT should never neglect the control of PRM infestations.

INTRODUZIONE

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1778), l'acaro rosso del pollame, rappresenta una notevole fonte di preoccupazione nel settore avicolo intensivo, a causa dell'impatto negativo che esercita sulla produttività e sul benessere degli animali [1]. Agli effetti diretti conseguenti alle infestazioni da *D. gallinae*, è oramai stato accertato che si aggiungono anche quelli indiretti, legati al ruolo che questo acaro può rivestire nella trasmissione di alcune malattie infettive del pollame [2]. Fra queste, una delle più rilevanti è rappresentata dalla Tifosi aviare, sostenuta da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) ser. Gallinarum. Nel corso degli anni diversi studi hanno evidenziato la relazione fra *D. gallinae* e *S. Gallinarum*, suggerendo che l'acaro possa fungere da reservoir del germe, favorendone la circolazione anche per più cicli produttivi consecutivi [3,4]. Recentemente la trasmissione di *S. Gallinarum* da parte di *D. gallinae* è stata dimostrata mediante prove in isolatori, che hanno evidenziato che gli acari, messi a contatto con animali infettati per via sperimentale, sono in grado di acquisire il patogeno ed in seguito di trasmetterlo ad animali sani [5]. Tale dimostrazione offre numerosi spunti di indagine riguardo i possibili meccanismi insiti nel ruolo vettoriale di *D. gallinae* nei confronti di *S. Gallinarum*, utili per poter comprendere al meglio la relazione fra acaro e patogeno e le possibili implicazioni in campo. Purtroppo fino ad ora non erano disponibili modelli sperimentali sufficientemente efficienti da utilizzare a supporto di questo tipo di ricerche.

Il sistema di alimentazione artificiale degli acari *in vitro* descritto recentemente da Nunn et al. (2020) [6] può risultare utile per superare queste difficoltà, consentendo la messa

a punto di protocolli standardizzati di ricerca e che garantiscono l'acquisizione di informazioni valide, in quanto riducono al minimo l'influenza di variabili incontrollate. Applicando questo metodo, è stato condotto uno studio che, tramite prove di feeding *in vitro*, ha valutato la trasmissione di *S. Gallinarum* da parte di *D. gallinae* per via verticale. In questo lavoro si riportano i primi risultati ottenuti.

MATERIALI E METODI

Prova di infezione in vitro

Per la prova di infezione *in vitro* sono stati realizzati degli appositi dispositivi secondo le indicazioni di Nunn et al. (2020) [6], costituiti da due camere separate da una membrana Baudruche (Preservation Equipment Ltd, Diss, UK). Gli acari sono stati prelevati in diversi allevamenti industriali di galline ovaiole. Una volta raccolti, sono stati sottoposti ad un periodo di *starvation* di 7 giorni a temperatura ambiente, per consentire la digestione del sangue al loro interno, ed in seguito utilizzati per le prove di feeding. Nella stessa giornata della prova è stato prelevato il sangue da galline ovaiole negative per *S. Gallinarum*, all'interno di provette addizionate con litio-eparina, per una concentrazione di 20 unità/mL di sangue, mantenendolo a +40°C fino al momento dell'utilizzo. In ciascun dispositivo sono state trasferite 50 femmine adulte mobili di *D. gallinae* ed 1 mL di sangue addizionato con 100 mL di una brodocoltura di *S. Gallinarum*, per una concentrazione finale di 10⁵ CFU/mL.

Una volta riempiti, i dispositivi sono stati tenuti a 40°C in condizioni di oscurità, per garantire agli acari di effettuare il pasto di sangue. Dopo 3 ore, gli acari ingorgati sono stati prelevati e trasferiti singolarmente nei pozzetti di una piastra per colture cellulari, sigillata da un foglio di AeraSeal (SigmaAldrich). La piastra è stata quindi incubata a 30°C per 72 e 120 ore.

Ricerca del patogeno

Considerato il ciclo biologico di *D. gallinae*, dopo 72 ore sono stati prelevati adulti, uova e larve, mentre dopo 120 ore sono state raccolte le protoninfe. In particolare, le uova sono state raccolte e processate singolarmente, previa denaturazione a 90°C per 10 minuti. Adulti, larve e protoninfe sono state raggruppate in pool da 5 esemplari per ogni stadio, estraendone il DNA mediante kit commerciali (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, Zymo Research, California, USA), secondo le indicazioni riportate dal produttore.

Il DNA è stato quindi analizzato tramite Real Time PCR (qPCR) per la ricerca e la quantificazione di *S. Gallinarum*, come precedentemente riportato da Pugliese et al. (2018) [4]. Le prove sono state condotte in duplicato per le uova ed in quadruplo per adulti, larve e protoninfe. Le reazioni sono state condotte su piattaforma CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) ed i dati sono stati analizzati mediante CFX Maestro Software (Bio-Rad Laboratories).

Analisi statistica

È stata calcolata la media della carica di *S. Gallinarum* rilevata in qPCR per le diverse ripetizioni di ciascun campione. In seguito è stata calcolata la deviazione standard, facendo attenzione che questa non fosse più alta del 10%.

RISULTATI

La ricerca di *S. Gallinarum* in *D. gallinae* ha evidenziato la presenza del germe in tutti gli stadi analizzati, come riportato in tabella 1.

Tabella 1. Risultati della qPCR per la ricerca di *S. Gallinarum* nelle singole uova(**) e nei pool (*) da 5 adulti, larve e protoninfe di *D. gallinae*.

	Adulti*	Uova**	Larve*	Protoninfe*
Campioni testati	4,0	13,0	8,0	3,0
Positivi per <i>S. Gallinarum</i>	4,0	1,0	1,0	2,0
%	100,0	7,7	12,5	66,7

In tabella 2 sono riepilogati i dati relativi alla quantificazione di *S. Gallinarum* nei campioni analizzati. La carica del patogeno è risultata molto variabile, in particolar modo all'interno dei pool di DNA da adulti.

Tabella 2. Carica media di *S. Gallinarum* nei diversi stadi di *D. gallinae* analizzati.

Stadio testato	Cellule per campione
Adulti	5131,7
Adulti	3,8
Adulti	145,8
Adulti	4,1
Uovo	35,6
Larve	45,5
Protoninfe	1457,4
Protoninfe	1441,3

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che *D. gallinae* è in grado non solo di acquisire *S. Gallinarum* con il pasto di sangue, ma anche di trasmetterla alle generazioni successive, almeno fino allo stadio di protoninfa. Infatti, tutti i campioni di adulti e almeno un'aliquota di uova, larve e protoninfe analizzati sono risultati positivi per *S. Gallinarum* in qPCR. Tale riscontro suggerisce che *Salmonella* possa essere trasmessa per via transovarica e trans-stadiale. In ogni caso, ricerche più approfondite sono necessarie per verificare se e in che modo il germe sia in grado di colonizzare l'ovaio delle femmine adulte di *D. gallinae*.

La carica di *S. Gallinarum* nei campioni analizzati, come già osservato in ricerche precedenti [4,5], è risultata estremamente variabile, sia all'interno delle popolazioni di adulti, che fra i vari stadi intermedi. È possibile che la distribuzione di *Salmonella* negli acari adulti a seguito del pasto di sangue abbia un carattere prettamente stocastico. L'andamento crescente della carica fra i vari stadi, invece, potrebbe essere legato ad un meccanismo "a collo di bottiglia". Infatti, la quantità di *S. Gallinarum* rilevata sembra ridursi nelle uova, per aumentare leggermente nelle larve, fino a raggiungere un valore più significativo nelle protoninfe. La tendenza osservata lascia quindi supporre che possa esserci un livellamento verso il basso della carica del germe negli stadi iniziali del ciclo biologico di *Dermanyssus* (uovo e larva). Inoltre, non è escluso che *S. Gallinarum* possa moltiplicarsi all'interno degli acari, come precedentemente ipotizzato per *Salmonella* Enteritidis [7].

Da sottolineare che il sistema di feeding adottato offre il vantaggio di controllare le condizioni dell'esperienza, confinando gli acari in un ambiente separato rispetto a quello dove è presente il sangue infetto. Questo fattore consente di investigare anche sulle modalità di acquisizione del patogeno da parte di *D. gallinae*. È stato ipotizzato, infatti, che l'acaro possa infettarsi tramite il pasto di sangue oppure a seguito di una contaminazione superficiale [7]. Sebbene quest'ultima ipotesi non sia comunque da escludere, è opportuno evidenziare che il metodo utilizzato consente di selezionare come unica fonte di contaminazione il pasto di sangue.

Il ruolo vettoriale di *D. gallinae* nei confronti di *S. Gallinarum* è ormai accertato [5], così come la sua capacità di favorire la persistenza del germe in allevamento [4]. Pertanto, se analizzata nell'ottica del contesto avicolo, la trasmissione verticale di *S. Gallinarum* da parte di *D. gallinae* rappresenta un punto critico aggiuntivo, poiché potrebbe ulteriormente favorire la persistenza o, addirittura, contribuire ad aumentare la carica del germe all'interno della popolazione di acari.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti, nonostante essi siano ancora preliminari e necessitino di ulteriori approfondimenti, è possibile affermare che *D. gallinae* è in grado di trasmettere per via verticale *S. Gallinarum*. Tale riscontro conferma l'importanza del controllo delle infestazioni da *D. gallinae* tra le misure da adottare per giungere all'eradicazione della Tifosi aviaria negli allevamenti avicoli intensivi.

BIBLIOGRAFIA

1. Sigognault Flochlay A, Thomas E and Sparagano O. (2017). Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites & Vectors*, 10, 357.
2. George RD, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Valiente Moro C and Sparagano OAE. (2015). Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? *Parasites & Vectors*, 8, 178.
3. Zeman P, Štika V, Skalka B, Bártík M, Dusbábek F and Lávičková M. (1982). Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullorosis-typhus in hens. *Folia parasitologica (Praha)*, 29, 371-374.
4. Pugliese N, Circella E, Marino M, De Virgilio C, Cocciolo G, Lozito P, Cafiero MA and Camarda A. (2018). Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 33, 162-170.
5. Cocciolo G, Circella E, Pugliese N, Lupini C, Mescolini G, Catelli E, Borchert-Stuhlträger M, Zoller H, Thomas E and A Camarda. (2020). Evidence of vector borne transmission of *Salmonella enterica enterica* serovar Gallinarum and fowl typhoid disease mediated by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Parasites & Vectors*, 13, 513.
6. Nunn F, Baganz J, Bartley K, Hall S, Burgess S and Nisbet A. (2020). An improved method for in vitro feeding of adult female *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) using Baudruche membrane (goldbeater's skin). *Parasites & Vectors*, 13, 585.
7. Valiente Moro C, Chauve C and Zenner L. (2007). Experimental infection of *Salmonella* Enteritidis by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology*, 146, 329-336.

RICERCA DI AVIAN METAPNEUMOVIRUS (aMPV) IN VOLATILI SELVATICI

Tucciarone C.M.¹, Franzo G.¹, Legnardi M.¹, Lupini C.², Catelli E.², Quaglia G.², Dal Molin E.³, Gobbo F.³, Cecchinato M.¹

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

² Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italia;

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.

Summary

The interest towards avian Metapneumovirus (aMPV) has recently increased due to the discovery of two new subtypes in gulls and parakeets, in addition to the four already known subtypes (A-D). The circulation of these subtypes in wild birds highlighted the necessity for a continuous evaluation of aMPV epidemiology to assure a strict monitoring of the wild and domestic animal interface and provide new diagnostic tools as the risk of new virus spread to farmed animals becomes tangible. With this aim, a molecular survey by multiplex real time RT-PCR for the detection of known and new aMPV subtypes was conducted on wild birds sampled during avian Influenza surveillance activity. All birds were negative for all subtypes, except for a mallard (*Anas platyrhynchos*) positive for aMPV subtype C. The mallard is a species close to the domestic environment and this finding supports the need for envisaging possible viral passage from wild birds to reared poultry.

INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV) è un patogeno comune nell'ambito dell'allevamento di pollo e tacchino e causa perdite economiche, legate al calo della produzione e al suo controllo (Rautenschlein, 2019). È conosciuto come agente di malattia respiratoria nel tacchino, ma può causare anche forme a carico dell'apparato riproduttivo, con calo dell'ovodeposizione e della qualità delle uova in ovaiole e riproduttori, forme complicate da infezioni batteriche secondarie, che possono esitare in manifestazioni conosciute come "Sindrome della testa gonfia" nel pollo (Cecchinato *et al.*, 2016) ed è in grado di causare malattia anche nelle anatre (Brown *et al.*, 2019).

In quanto virus con un genoma a singolo filamento di RNA, è caratterizzato da una notevole variabilità genetica (Cook, 2000), che ha portato all'iniziale distinzione di quattro sottotipi (A-D) (Juhász & Easton, 1994; Seal, 1998; Bayon-Auboyer *et al.*, 2000), sulla base di caratteristiche antigeniche e genetiche. Di questi, il sottotipo D non è più stato identificato, mentre i più diffusi a livello di allevamento sono i sottotipi A e B (Franzo *et al.*, 2020; Mescolini *et al.*, 2021) e il sottotipo C è ampiamente diffuso negli Stati Uniti, sia nella popolazione domestica allevata (Goyal *et al.*, 2003) sia in quella selvatica (Turpin *et al.*, 2008).

Recentemente due nuovi sottotipi sono stati identificati nel parrocchetto (Retallack *et al.*, 2019) e nel gabbiano (Canuti *et al.*, 2019), ma mancano ancora informazioni sulla loro patogenicità e diffusione. La presenza di questo virus nella popolazione selvatica

ne ha suggerito un ruolo di reservoir e di diffusione (Jardine *et al.*, 2018), stimolando la necessità di un monitoraggio, ancor più essenziale dopo la comparsa di nuovi sottotipi emergenti. Questo studio si è avvalso del campionamento effettuato nell'ambito della sorveglianza per l'Influenza aviaria sui volatili selvatici, condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), per effettuare un'indagine biomolecolare per la ricerca dei sottotipi noti di aMPV.

MATERIALI E METODI

I campioni sono stati raccolti durante l'attività di sorveglianza attiva e passiva per l'Influenza aviaria, condotta dall'IZSVe nella zona del Nord-Est Italia. Le matrici campionate consistevano in tamponi orofaringei, tracheali o cloacali, feci o organi come polmoni e reni. I campioni sono stati processati per l'estrazione degli acidi nucleici presso l'IZSVe e le piastre contenenti gli estratti sono state conferite al laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS e conservate a -80°C fino alla processazione. Le informazioni riguardanti data e luogo di campionamento, specie, età e matrice sono state organizzate in un database ed associate agli identificativi dei campioni.

Sono stati selezionati solo gli estratti di matrici come tamponi orofaringei, tracheali e polmoni e sono stati aggregati in pool di 8 campioni secondo la disposizione su piastra. Per la ricerca dei vari sottotipi di aMPV sono state utilizzate due metodiche di multiplex real time RT-PCR eseguite con il kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, USA) su termociclatore LightCycler® 96 (Roche, Svizzera). Per la ricerca dei sottotipi A e B è stata utilizzata la metodica descritta da Cecchinato *et al.* (2013) (Cecchinato *et al.*, 2013), mentre per la ricerca del sottotipo C e dei nuovi sottotipi identificati in gabbiano e parrocchetto è stata utilizzata una metodica validata presso il laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS, su di un plasmide contenente le regioni target dei vari sottotipi (primer, probe e protocollo disponibili su richiesta). I campioni facenti parte di pool positivi sono stati analizzati singolarmente con le stesse metodiche per confermare l'eventuale positività e attribuirli al singolo individuo. I campioni positivi sono stati processati con le metodiche disponibili di RT-PCR (Shin, Rajashekar, *et al.*, 2000; Cecchinato *et al.*, 2010) con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen™, USA) su termociclatore Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) e successivo sequenziamento Sanger con i medesimi primer, per ottenere la conferma diagnostica e la caratterizzazione genetica dei ceppi. I cromatogrammi sono stati valutati dal punto di vista qualitativo con il software FinchTV (Geospiza Inc., USA) e assemblati in sequenze consenso con il software ChromasPro 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd, Australia). Le sequenze sono state allineate a sequenze di riferimento scaricate da GenBank ed è stato ricostruito un albero filogenetico con metodo Maximum Likelihood utilizzando il software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

RISULTATI

Sono stati ottenuti gli estratti di 1932 campioni, di cui 1761 tamponi tracheali, 160 tamponi orofaringei e 11 aliquote di polmoni. Il campionamento è stato effettuato nel periodo 2018-2021, nelle province di Bolzano (n. 10), Ferrara (n. 47), Pisa (n. 52), Padova (n. 825), Rovigo (n. 713), Treviso (n. 19), Venezia (n. 208), Verona (n. 28), Vicenza (n. 30) (Figura 1). La numerosità degli individui appartenenti alle 32 specie campionate è riportata in Tabella 1.

Tabella 1: numerosità dei volatili campionati e specie di appartenenza.

Volatile	Ordine	Specie	N.
Airone guardabuoi	<i>Pelecaniformes</i>	<i>Bubulcus ibis</i>	1
Alzavola comune	<i>Anseriformes</i>	<i>Anas crecca</i>	261
Canapiglia	<i>Anseriformes</i>	<i>Mareca strepera</i>	37
Canapino	<i>Passeriformes</i>	<i>Hippolais polyglotta</i>	8
Cannaiola	<i>Passeriformes</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	41
Cannaiola verdognola	<i>Passeriformes</i>	<i>Acrocephalus palustris</i>	17
Cannareccione	<i>Passeriformes</i>	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	1
Capinera	<i>Passeriformes</i>	<i>Sylvia atricapilla</i>	41
Cinciallegra	<i>Passeriformes</i>	<i>Parus major</i>	6
Codibugnolo	<i>Passeriformes</i>	<i>Aegithalos caudatus</i>	4
Codone comune	<i>Anseriformes</i>	<i>Anas acuta</i>	21
Cormorano	<i>Suliformes</i>	<i>Phalacrocorax carbo</i>	10
Fagiano	<i>Galliformes</i>	<i>Phasianus colchicus</i>	2
Fischione	<i>Anseriformes</i>	<i>Mareca penelope</i>	230
Folaga comune	<i>Gruiformes</i>	<i>Fulica atra</i>	1
Gallinella d'acqua	<i>Gruiformes</i>	<i>Gallinula chloropus</i>	4
Germano reale	<i>Anseriformes</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>	862
Lui piccolo	<i>Passeriformes</i>	<i>Phylloscopus collybita</i>	1
Martin pescatore	<i>Coraciiformes</i>	<i>Alcedo atthis</i>	6
Marzaiola	<i>Anseriformes</i>	<i>Spatula querquedula</i>	256
Merlo	<i>Passeriformes</i>	<i>Turdus merula</i>	6
Mestolone	<i>Anseriformes</i>	<i>Spatula clypeata</i>	70
Moriglione	<i>Anseriformes</i>	<i>Aythya ferina</i>	3
Oca selvatica	<i>Anseriformes</i>	<i>Anser anser</i>	1
Passera d'Italia	<i>Passeriformes</i>	<i>Passer italiae</i>	3
Picchio	<i>Piciformes</i>	<i>Dryocopus martius</i>	1
Picchio verde	<i>Piciformes</i>	<i>Picus viridis</i>	1
Porciglione	<i>Gruiformes</i>	<i>Rallus aquaticus</i>	1
Pettirosso	<i>Passeriformes</i>	<i>Erithacus rubecula</i>	2
Storno	<i>Passeriformes</i>	<i>Sturnus vulgaris</i>	1
Usignolo	<i>Passeriformes</i>	<i>Luscinia megarhynchos</i>	7
Usignolo di fiume	<i>Passeriformes</i>	<i>Cettia cetti</i>	24
Non identificato			2
Totale			1932

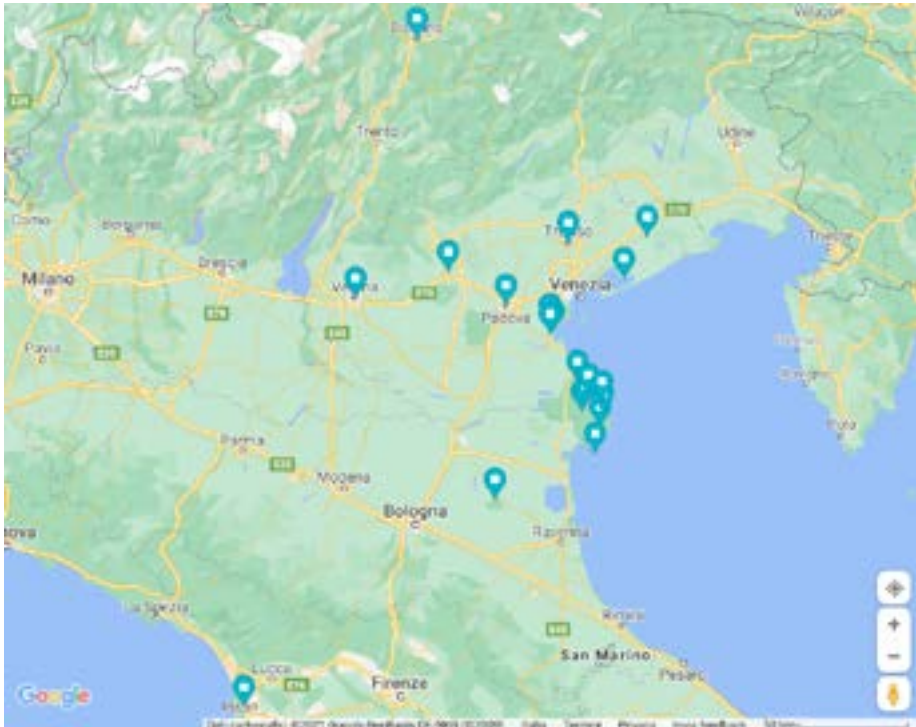


Figura 1: mappa dei luoghi in cui è stato effettuato il campionamento per aMPV nei volatili selvatici.

Gli estratti sono stati assemblati in 262 pool, risultati tutti negativi per la ricerca dei sottotipi A e B e dei nuovi sottotipi identificati in gabbiano e parrocchetto, permettendo quindi di escludere una prevalenza superiore a 0,15% (IC 95%) assumendo una dimensione della popolazione > 100000.

Un pool è risultato positivo per il sottotipo C e, una volta testati i campioni singolarmente, un solo tampone tracheale di germano reale (*Anas platyrhynchos*) raccolto in provincia di Padova nel 2018 è risultato positivo (0,12%; 95% IC=0,00-0,34%) su un campione di 862 di germani reali testati. L'analisi filogenetica ha rivelato una similarità nucleotidica (98,5-99,0%) del ceppo italiano con dei ceppi di aMPV sottotipo C identificati negli USA in tacchini e oche tra il 1999 e il 2004 (Figura 2).

Nella restante popolazione selvatica è possibile escludere una prevalenza dell'infezione da aMPV sottotipo C superiore a 0,28% (IC 95%).

DISCUSSIONE

Grazie alla collaborazione con l'IZSVe, è stato possibile ottenere un vasto numero di campioni di volatili selvatici, appartenenti a molte specie diverse, dai quali però non è emersa alcuna positività per aMPV, tranne in un singolo caso di un germano reale positivo per il sottotipo C. L'assenza di positività per i sottotipi più comuni e più diffusi nell'ambito dell'allevamento del pollo e del tacchino rassicura sull'entità del rischio che le specie selvatiche possono costituire per quelle domestiche.

Nel presente studio sono state analizzate diverse specie afferenti ad ordini in cui erano state evidenziate positività per aMPV in letteratura. Il sottotipo C è stato individuato in Passeriformi come passeri, storni e rondini (Shin, Njenga, *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2004), Anseriformi come mestolone comune, marzaiola americana, fischione americano, anatra nera americana, anatra sposa (Jardine *et al.*, 2018), germano reale, oca selvatica (van Boheemen *et al.*, 2012) e oca canadese (Turpin† *et al.*, 2008), in Gruiformi come la folaga americana e Pelicaniformi come l'airone guardabuoi (Turpin† *et al.*, 2008). In altri Anseriformi come la dendrocigna facciabianca (Felippe *et al.*, 2011; Rizotto *et al.*, 2019) era stato individuato il sottotipo B; nell'oca dell'Orinoco (Felippe *et al.*, 2011) e nell'anatra mandarina (Rizotto *et al.*, 2019) il sottotipo A, mentre nel codone guancebianche sono stati rilevati entrambi i sottotipi A e B (Felippe *et al.*, 2011). Per contro, nonostante l'elevata numerosità totale di animali, molte specie sono sottorappresentate e la dimensione campionaria limitata potrebbe aver precluso la possibilità di individuare animali infetti, soprattutto in caso di basse prevalenze come quelle attese per l'infezione da aMPV.

L'utilizzo di strumenti biomolecolari permette inoltre la diagnosi diretta del patogeno e di un'infezione attiva o, al massimo, subclinica, mancando inevitabilmente di identificare animali che siano entrati precedentemente in contatto con il virus. Per avere una descrizione più approfondita dell'epidemiologia di aMPV sarà necessario affiancare agli strumenti molecolari anche indagini sierologiche, per raccogliere inoltre informazioni su quali siano le specie più suscettibili, sul loro ruolo di reservoir e per pianificare lo studio della biologia dell'infezione anche in questi ospiti.

D'altra parte, tra le specie campionate sono assenti gabbiani e parrocchetti, in cui i nuovi sottotipi sono stati identificati e potrebbero essere maggiormente diffusi: l'assenza quindi di questi sottotipi in altre specie non permette di trarre conclusioni in merito alla loro presenza sul territorio italiano, suggerendo quindi l'opportunità di studi dedicati alla ricerca di questi sottotipi in Caradriiformi e Psittaciformi.

La presenza invece di un germano reale positivo per il sottotipo C si affianca al recente ritrovamento di un gruppo di germani allevati risultati positivi sierologicamente per il sottotipo C (Legnardi *et al.*, 2021), stimolando quindi una certa attenzione nei confronti di questa specie, dalla riprovata suscettibilità e che potrebbe fungere da nesso epidemiologico tra la popolazione domestica e quella selvatica, in entrambe le direzioni. Il ceppo identificato nel germano fa parte di un cluster in cui sono presenti ceppi americani di tacchini e oche, mentre è filogeneticamente distante (96,4% di similarità nucleotidica) rispetto all'unico altro ceppo di aMPV sottotipo C italiano identificato finora in un fischione (Silveira *et al.*, 2018), che a sua volta era parte di un cluster con sequenze americane e una sequenza francese. Questa eterogeneità, per quanto inferiore

essendo valutata sul gene M caratterizzato da minore variabilità rispetto ad altre regioni genomiche, supporta ancora una volta le considerazioni sull'esistenza di cluster virali distinti all'interno del sottotipo C (Toquin *et al.*, 2006), ma sembra indebolire la base geografica di questa suddivisione, anche se la mancanza di sequenze europee di aMPV sottotipo C non permette una ricostruzione dettagliata delle relazioni filogenetiche all'interno di questo sottotipo.

CONCLUSIONI

La limitata circolazione dei sottotipi più diffusi, A e B, e del sottotipo C di aMPV nella popolazione selvatica circoscrive quindi il rischio di contaminazione per la specie domestica. La conferma della presenza sul territorio del sottotipo C, apparentemente non ancora entrato in allevamento o quantomeno non ancora identificato, sottolinea invece l'esigenza di approfondire il monitoraggio delle specie selvatiche, affinando le conoscenze sulla circolazione di questo sottotipo e preparando degli strumenti diagnostici adeguati, qualora facesse il suo ingresso in allevamento. Infatti, nel caso di sintomatologia suggestiva di infezione da aMPV in allevamento, ma in assenza di positività ai comuni metodi diagnostici, potrebbe essere utile ricorrere ad esami sierologici che possano mettere in luce un'infezione pregressa da aMPV ed indicare quindi la possibile presenza di un sottotipo non rilevato, per ragioni di specificità diagnostica limitata ai sottotipi più diffusi.

BIBLIOGRAFIA

1. Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D. & Etteradossi, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *Journal of General Virology*, *81*, 2723–2733.
2. Bennett, R.S., Nezworski, J., Velayudhan, B.T., Nagaraja, K. V., Zeman, D.H., Dyer, N., Graham, T., Lauer, D.C., Njenga, M.K. & Halvorson, D.A. (2004). Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Diseases*, *48*, 902–908.
3. Brown, P.A., Allée, C., Courtillon, C., Szerman, N., Lemaitre, E., Toquin, D., Mangart, J.-M.M., Amelot, M. & Etteradossi, N. (2019). Host specificity of avian metapneumoviruses. *Avian Pathology*, *48*, 311–318.
4. Canuti, M., Kroyer, A.N.K., Ojkic, D., Whitney, H.G., Robertson, G.J. & Lang, A.S. (2019). Discovery and characterization of novel rna viruses in aquatic North American wild birds. *Viruses*, *11*.
5. Cecchinato, M., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Clubbe, J., Battilani, M. & Naylor, C.J. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology*, *146*, 24–34.
6. Cecchinato, M., Ferreira, H.L., Munir, M. & Catelli, E. (2016). Avian Metapneumovirus. *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Molecular Epidemiology and Control* (CAB International., Vol. 2, pp. 127–143).
7. Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O.S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M. & Catelli, E. (2013). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathology*, *42*, 283–289.

8. Cook, J.K.A. (2000, September 1). Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. *Veterinary Journal*.
9. Felipe, P.A., da Silva, L.H.A., dos Santos, M.B., Sakata, S.T. & Arns, C.W. (2011). Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology*, *40*, 445–452.
10. Franzo, G., Legnardi, M., Mescolini, G., Tucciarone, C.M., Lupini, C., Quaglia, G., Catelli, E. & Cecchinato, M. (2020). Avian Metapneumovirus subtype B around Europe: a phylodynamic reconstruction. *Veterinary Research*, *51*, 1–10.
11. Goyal, S.M., Lauer, D., Friendshuh, K. & Halvorson, D.A. (2003). Seroprevalence of avian pneumovirus in Minnesota turkeys. *Avian Diseases*, *47*, 700–706.
12. Jardine, C.M., Parmley, E.J., Buchanan, T., Nituch, L. & Ojkic, D. (2018). Avian metapneumovirus subtype C in Wild Waterfowl in Ontario, Canada. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*, 1098–1102.
13. Juhasz, K. & Easton, A.J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: Evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology*, *75*, 2873–2880.
14. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547–1549.
15. Legnardi, M., Allée, C., Franzo, G., Cecchinato, M. & Brown, P. (2021). Research Note: Detection of Avian metapneumovirus subgroup C specific antibodies in a mallard flock in Italy. *Poultry Science*, *100*, 101186.
16. Mescolini, G., Lupini, C., Franzo, G., Quaglia, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Turblin, V., Biarnés, M., Tatone, F., Falchieri, M. & Catelli, E. (2021). What is new on molecular characteristics of Avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*, 1314–1322.
17. Rautenschlein, S. (2019). Avian Metapneumovirus. *Diseases of Poultry* (14th ed., pp. 135–143).
18. Retallack, H., Clubb, S. & DeRisi, J.L. (2019). Genome Sequence of a Divergent Avian Metapneumovirus from a Monk Parakeet (*Myiopsitta monachus*). *Microbiology Resource Announcements*, *8*.
19. Rizotto, L.S., Simão, R.M., Scagion, G.P., Simasaki, A.A., Caserta, L.C., Benassi, J.C., Arns, C.W. & Ferreira, H.L. (2019). Detection of avian metapneumovirus subtype A from wild birds in the State of São Paulo, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *39*, 209–213.
20. Seal, B.S. (1998). Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Research*, *58*, 45–52.
21. Shin, H.J., Njenga, M.K., McComb, B., Halvorson, D.A. & Nagaraja, K. V. (2000). Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*, 4282–4284.
22. Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. & Nagaraja, K. V. (2000). Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Archives of Virology*, *145*, 1239–1246.

23. Silveira, F., Lupini, C., Cecchinato, M., Giovanni, F., Tucciarone, C.M., Mescolini, G., Felice, V., Martini, M., Terregino, C. & Catelli, E. (2018). Evidenza di circolazione di Metapneumovirus aviare sottotipo C in un fischione (*Anas penelope*) campionato in Nord Italia. *III Simposio Scientifico SIPA* (pp. 167–172).
24. Toquin, D., Guionie, O., Jestin, V., Zwingelstein, F., Allee, C. & Etteradossi, N. (2006). European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*, *32*, 97–103.
25. Turpin†, E.A., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Zsak, L. & Swayne, D.E. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathology*, *37*, 343–351.
26. van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Verhagen, J.H., Osterhaus, A.D.M.E., Pas, S.D., Herfst, S. & Fouchier, R.A.M. (2012). A family-wide rt-pcr assay for detection of paramyxoviruses and application to a large-scale surveillance study. *PLoS ONE*, *7*.



UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI MOLECOLE VEGETALI IN UN MODELLO DI COCCIDIOSI IN POLLI DA CARNE

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

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

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

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

Summary

Chicken coccidiosis is a parasitic disease caused by *Eimeria* spp. Research has focused on finding new alternatives to fight these pathogens and botanicals have gained much interest in this field. The aim of this study was to test the anticoccidial activity of a microencapsulated blend of botanicals *in vivo* in broilers artificially infected with coccidia.

A total of 1,500 day-old chicks (Cobb 500) were divided into pens (50 chicks/pen) and assigned to 3 groups (10 pens/group): negative control (NEG) group, fed a basal diet, not challenged; positive control (POS) group, fed a basal diet, challenged with cocci; treated (TRT) group, fed a basal diet supplemented with a microencapsulated blend of botanicals at 250 g/MT, challenged with cocci. The challenge with cocci consisted of an oral inoculation with a multispecies *Eimeria* inoculum (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*) at day 21. The study lasted 42 days with intestinal lesions and oocysts per gram (OPG) of feces determined on day 28, and growth performance recorded throughout the study. Data were analyzed with ANOVA and differences considered significant at $P < 0.05$.

In the first week after the infection with cocci, the challenge did have a negative impact on growth performance for the POS group compared to the NEG control, while the treated group, despite the challenge, showed already significantly better body weight gain and FCR. From the cocci challenge to the end and for the overall period, FCR of treated group was comparable to the negative control non-challenged group ($P < 0.001$). Moreover, the treated group showed reduced intestinal lesion scores for *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* at d28 ($P < 0.05$) and numerically lower fecal shedding of oocysts compared to positive control.

To conclude, the microencapsulated blend of botanicals used in this study has the potential to contain loss of performance and intestinal lesions associated with coccidiosis challenge in broiler chickens.

INTRODUZIONE

La coccidiosi è una delle più comuni ed economicamente più importanti patologie del settore avicolo, causata da protozoi appartenenti al genere *Eimeria*. Tale patologia intestinale è caratterizzata da una forte riduzione delle performance di crescita degli animali con un impatto economico stimato fino a 13 miliardi di dollari di perdite ogni anno (Blake et al. 2020). Inoltre, il danno alla mucosa intestinale causato da *Eimeria* spp è considerato il principale fattore predisponente dell'enterite necrotica causata da *C. perfringens*, largamente ritenuta una delle principali minacce per l'in-

dustria avicola globale (Quiroz-Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015; Timbermont et al., 2011).

Una corretta gestione dell'allevamento è fondamentale per il controllo della patologia, ma data la sua frequenza e la sua diffusione sono necessari una prevenzione ed un controllo di tipo farmacologico. Tali trattamenti prevedono l'utilizzo, sotto regolamentazione, di farmaci anticoccidici, solitamente alternati a programmi di vaccinazione nei periodi estivi (Quiroz-Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015; Györke et al., 2013). A causa di sempre più frequenti fenomeni di resistenza ai trattamenti tradizionali, si è resa necessaria la ricerca di nuove molecole efficaci per il controllo di questi patogeni. In questo contesto, grande interesse è stato dato alle molecole vegetali che hanno mostrato attività anticoccidiche *in vitro*, interferendo in vari modi con il ciclo vitale di *Eimeria* (Felici et al., 2020)

L'obiettivo di questo studio è valutare l'attività anticoccidica di una miscela microincapsulata di molecole vegetali *in vivo* in polli da carne infettati artificialmente con coccidi di *Eimeria*.

MATERIALI E METODI

Un totale di 1500 polli da carne (Cobb 500) al giorno 0 di vita sono stati allocati in box (50 animali/box) e assegnati a 3 gruppi sperimentali (10 box/gruppo):

Gruppo controllo negativo (NEG), alimentato con una dieta standard, non sottoposto a *challenge* con coccidi;

Gruppo controllo positivo (POS), alimentato con una dieta standard, sottoposto a *challenge* con coccidi;

Gruppo trattato (TRT) alimentato con una dieta standard supplementata con una miscela microincapsulata di molecole vegetali a 500 g/ton, sottoposto a *challenge* con coccidi.

Le diete sono state fornite *ad libitum* a partire dall'accasamento secondo questo piano alimentare: fase starter (giorno 0-21), fase grower (giorno 21-35), fase finisher (giorno 35-42). Le diete consistevano in mangimi commerciali, non medicati, formulati sulla base delle indicazioni NRC e fornite come pellet sbriciolato (starter) o come pellet (grower e finisher).

Il *challenge* con coccidi è consistito nella somministrazione orale di un inoculo multi-specie di *E. acervulina* (100000 oocisti/animale), *E. maxima* (50000 oocisti/animale), *E. tenella* (75000 oocisti/animale) al giorno 21. Al giorno 28, 5 animali/box sono stati sacrificati ed esaminati per le lesioni intestinali da *Eimeria* secondo il metodo di score di Johnson e Reid (1970), ossia una scala da 0 a 4 di gravità crescente con punteggio 0 per intestino normale e 4 per intestino con le lesioni più gravi. Al giorno 28 sono stati raccolti campioni fecali da ogni box per la conta del numero di oocisti per grammo (OPG) di feci mediante metodica Mc Master al fine di determinare l'eliminazione fecale delle specie di *Eimeria*.

Per determinare le performance di crescita, sono stati registrati l'alimento somministrato e il peso vivo per box ai giorni 0, 21, 28, 35 e 42. Conseguentemente sono stati calcolati parametri di crescita quali l'ingestione alimentare, l'incremento ponderale e l'indice di conversione alimentare aggiustato sulla base della mortalità.

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

RISULTATI

Performance di crescita

I risultati delle performance di crescita sono riportati nella Tabella 1. Nel periodo 0-21 giorni, prima dell'infezione con coccidi, non sono state osservate differenze nei parametri di crescita dei gruppi. Nella prima settimana dopo l'infezione, si è visto che il *challenge* ha avuto un impatto negativo sulla crescita del gruppo POS rispetto al controllo negativo NEG, come evidenziato da un ridotto accrescimento ponderale e un aumentato indice di conversione alimentare ($P < 0.0001$). Contemporaneamente, il gruppo trattato ha mostrato performance migliori, nonostante il challenge, con valori di accrescimento ponderale e di indice di conversione intermedi tra il gruppo NEG e il gruppo POS e significativamente migliori rispetto al controllo POS ($P < 0.0001$). Dall'infezione con coccidi alla fine dello studio (giorni 21-42) e nel complesso (giorni 0-42), l'indice di conversione del gruppo trattato è risultato comparabile a quello del controllo negativo non infettato, entrambi significativamente più bassi rispetto ai valori del gruppo POS ($P < 0.0001$).

Tabella 1 - Performance di crescita

	Controllo negativo (NEG)	Controllo positivo (POS)	Trattato (TRT)	P
Fase: giorno 0-21				
Ingestione di alimento (kg/box)	48.74a	51.75b	50.05ab	0.001
Incremento ponderale (kg/capo)	0.667	0.718	0.688	0.21
Indice di conversione alimentare*	1.376	1.368	1.378	0.80
Fase: giorno 21-28				
Ingestione di alimento (kg/box)	33.32	32.81	32.17	0.18
Incremento ponderale (kg/capo)	0.425a	0.278b	0.347c	<0.0001
Indice di conversione alimentare*	1.594a	2.445b	1.884c	0.0001
Fase: giorno 21-42				
Ingestione di alimento (kg/box)	116.40	124.32	124.88	0.06
Incremento ponderale (kg/capo)	1.424	1.407	1.497	0.12
Indice di conversione alimentare*	1.843a	2.015b	1.849a	<0.0001
Totale: giorno 0-42				
Ingestione di alimento (kg/box)	165.15a	176.06b	174.93b	0.01
Incremento ponderale (kg/capo)	2.091	2.125	2.185	0.15
Indice di conversione alimentare*	1.677a	1.770b	1.684a	<0.0001

* aggiustato sulla base della mortalità

Lesioni intestinali ed eliminazione fecale di Eimeria

In Tabella 2 sono presentati i risultati delle lesioni intestinali e dell'eliminazione fecale di *Eimeria*. Rispetto al gruppo POS, il gruppo trattato ha mostrato ridotte lesioni intestinali causate da *E. acervulina*, *E. maxima* ed *E. tenella* ($P < 0.05$) ed una riduzione numerica nell'eliminazione di *Eimeria* nelle feci.

Tabella 2 – Lesioni intestinali ed eliminazione fecale di *Eimeria*

	Controllo positivo (POS)	Trattato (TRT)	<i>P</i>
Lesioni			
<i>E. acervulina</i>	2.64	1.88*	0.001
<i>E. maxima</i>	1.72	1.06*	0.002
<i>E. tenella</i>	2.38	1.38	0.003
Oocisti per grammo (OPG) di feci			
<i>E. acervulina</i>	23202	17655	0.19
<i>E. maxima</i>	3095	777	0.09
<i>E. tenella</i>	15249	10994	0.62
<i>Eimeria</i> totale	41547	29426	0.17

DISCUSSIONE

Questo studio si prefiggeva l'obiettivo di valutare l'attività anticoccidica di una miscela microincapsulata di molecole vegetali *in vivo* in polli da carne infettati artificialmente con coccidi di *Eimeria*. Come modello di coccidiosi è stato utilizzato un protocollo di infezione con *E. acervulina*, *E. maxima* ed *E. tenella* per riprodurre una condizione di infezione multi-specie molto comune nella realtà di campo. Questa infezione multi-specie ha effettivamente avuto un impatto negativo sulle performance di crescita degli animali, rispetto agli animali di controllo. In questo modello, la supplementazione alimentare con una miscela microincapsulata di molecole vegetali ha permesso di evitare la perdita di performance causata dall'infezione, mostrando parametri di crescita paragonabili al gruppo non infettato. Questo risultato macroscopico è spiegato dall'azione benefica del trattamento a livello intestinale, come indicato dalle ridotte lesioni intestinali causate da *E. acervulina*, *E. maxima* ed *E. tenella*, ossia lungo tutto il tratto intestinale (prossimale, medio e distale). Tale evidenza è coerente con l'attività anticoccidica dimostrata *in vitro* per varie molecole vegetali e suggerisce che la microincapsulazione possa essere uno strumento valido per indirizzare l'azione anticoccidica lungo tutto il tratto intestinale dove le varie specie di *Eimeria* sono localizzate e necessitano di essere controllate.

CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che l'infezione artificiale con *Eimeria* multi-specie utilizzata in questa prova può provocare una riduzione delle performance di crescita di polli da carne, tipica della coccidiosi di campo. In questo modello di coccidiosi, l'integrazione alimentare con una miscela microincapsulata di molecole vegetali può prevenire la perdita di crescita, riducendo le lesioni intestinali causate da *Eimeria*.

BIBLIOGRAFIA

1. Blake DP, Knox J, Dehaeck B, Huntington B, Rathinam T, Ravipati V, Ayoade S, Gilbert W, Adebambo AO, Jatau ID, Raman M, Parker D, Rushton and FM Tomley. (2020). Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet. Res.* 51: 1-14.
2. Quiroz-Castaneda RE and E Dantan-Gonzalez. (2015). Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 430610, 11 pages.
3. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R and F Van Immerseel (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40(4): 341-347.
4. Györke A, Pop L and V Cozma. (2013). Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. *Parasite* 20: 50.
5. Felici M, Tugnoli B, Piva A and E Grilli. (2021). In Vitro Assessment of Anticoccidials: Methods and Molecules. *Animals* 11: 1962-1981.
6. Johnson J and M Reid. (1970). Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol* 28(1): 30-36.



INDICE DEGLI AUTORI

A

Abdel-Moneim A.S. 59
Alberti S. 35
Ali A. 59

B

Baigent S.J. 125
Bano L. 29
Ben Chehida N. 135
Benedetti V. 73, 111
Berto G. 135
Blasi F. 93
Borrelli L. 173
Bottinelli M. 117
Bozzo G. 43
Branciaro R. 93

C

Camarda A. 43, 159, 179
Cannizzo F. T. 51
Casagrande Proietti P. 93
Casalino G. 43
Catelli E. 73, 85, 111, 125, 135, 155, 183
Cecchinato M. 59, 79, 101, 183
Cesca A. 35
Cibin V. 25
Cioffi A. 101
Circella E. 43, 159, 179
Cordioli B. 29
Cornaggia M. 29
Cristovao Borges L. 117
Cuccato M. 51

D

Dall'Angelo A. 101
Dal Molin E. 183
D'Amico F. 43, 179
Di Francesco A. 135

Dipineto L. 79, 173
Divari S. 51
Drigo I. 29

E

El-Sawah A.A. 59

F

Fanelli A. 85
Fioretti A. 79, 173
Franciosini M. P. 93
Franzo G. 59, 79, 101, 183

G

Garavini G. 101
Gavazzi L. 117
Ghiselli F. 143
Giudice C. 73, 111
Gobbo F. 183
Grassi L. 59, 79
Graziosi G. 85
Grilli E. 143, 193

H

Hassan K. E. 59
Houta M. H. 59

K

Koutoulis K. 135

L

Laconi A. 51
Legnardi M. 59, 79, 101, 183

Lombardi R. 43, 159
Lupini C. 23, 73, 85, 111, 135, 155, 183

M

Marenzoni M. L. 93
Matucci A. 117
Menandro M.L. 79
Menna L.F. 173
Merenda M. 117
Mescolini G. 73, 111, 125, 135
Minichino A. 79, 173
Muccioli F. 135
Musa L. 93

N

Nair V.K. 125
Nurisso S. 51

O

Ortali G. 73, 111

P

Pace A. 173
Palazzolo L. 29
Paparounis T. 135
Perona G. 51
Picchi M. 117
Piccirillo A. 51
Piva A. 143, 193
Prandini F. 73, 111
Pregel P. 51
Prentza Z. 135
Pugliese N. 159

Q

Quaglia G. 73, 111, 135, 155, 183

R

Romito D. 43
Rossi B. 143
Russo E. 155
Russo T.P. 173

S

Sakhria S. 135
Salvatore D. 135
Samarelli R. 159, 179
Santaniello A. 173
Scaglione F. E. 51
Schiavone A. 159, 179
Serenio A. 51
Shtylla Kika T. 93
Siclari C. 35
Siddique I. 159
Stefanetti V. 93
Stefani E. 117

T

Tecilla M. 73, 111
Terregino C. 21
Tondo A. 117
Tonellato F. R. 101
Toppi V. 93
Trevisani G. 101
Tucciarone C.M. 59, 79, 101, 183
Tugnoli B. 193

V

Varriale L. 173
Vasumi G. 35
Viel L. 29
Volorio A. 73, 111

la Salute Animale per la Salute dell'Uomo



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



IL 100% DELLA
VACCINAZIONE
COCCIDIOSI
È POSSIBILE

EVANT®

con **HIPRAMUNE® T**

Sospensione e solvente per spray orale per polli

Vaccino vivo attenuato contro la coccidiosi
nei polli in sospensione per spray orale

Powered by

**HIPRA
SMART
VACCINATION®**

EVANT® sospensione e solvente per spray orale per polli. **COMPOSIZIONE:** ogni dose (0,007 ml) di vaccino non diluito contiene: *Eimeria acervulina* ceppo 003, 332-450*; *Eimeria maxima* ceppo 013, 196-265*; *Eimeria mitis* ceppo 006, 293-397*; *Eimeria praecox* strain 007, 293-397*; *Eimeria tenella* ceppo 004, 276-374*. *Numero di oocisti sporulate. **SOLVENTE:** HIPRAMUNE® T. **INDICAZIONI:** per l'immunizzazione attiva dei pulcini a partire da 1 giorno di età per ridurre le lesioni intestinali e la produzione di oocisti associate a coccidiosi provocata da *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* ed *Eimeria tenella* e per ridurre segni clinici (diarrea) associati a *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella*. Inizio dell'immunità: 14 giorni dopo la vaccinazione. **POSOLOGIA E VIA DI SOMMINISTRAZIONE:** per uso orale. Il metodo di somministrazione è mediante spray a gocce grosse servendosi di un dispositivo adatto. Prima di iniziare la preparazione, verificare di avere a disposizione un contenitore pulito con capacità sufficiente alla preparazione della sospensione di vaccino diluita; capacità da 280 ml, 1.400 ml o 2.800 ml rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi. Aggiungere dell'acqua a temperatura ambiente (223 ml, 1.115 ml o 2.230 ml di acqua rispettivamente per i flaconi da 1.000, 5.000 o 10.000 dosi). Agitare il flacone del solvente. Diluire il contenuto del flacone con acqua pulita a temperatura ambiente in un contenitore adeguato. Agitare il flacone del vaccino e diluire il contenuto nella soluzione preparata. Dopo la diluizione si ottiene una sospensione violacea. Riempire il serbatoio del dispositivo nebulizzatore con la sospensione di vaccino preparata. Durante la somministrazione ai pulcini mediante spray a gocce grosse, mantenere la sospensione di vaccino diluito costantemente omogeneizzata, usando un agitatore magnetico. Per migliorare l'uniformità della vaccinazione, è consigliabile tenere i pulcini all'interno del box di trasporto per almeno 1 ora, in modo che possano assimilare tutte le gocce di vaccino. Dopo questo periodo di tempo, posare i pulcini delicatamente sulla lettiera e proseguire con le regolari pratiche di gestione. **POSOLOGIA:** una dose di vaccino (0,007 ml) a partire da 1 giorno di età. **REAZIONI AVVERSE:** nessuna. **TEMPO DI ATTESA:** 0 giorni. **PRECAUZIONI SPECIALI:** i polli nelle prime 3 settimane dopo la vaccinazione debba essere assolutamente allevati a terra. Si raccomanda di eliminare la lettiera e di pulire le strutture e i materiali fra i cicli di produzione per ridurre le infezioni di campo. Non deve essere utilizzata nessuna sostanza anticoccidica o altri agenti con attività anticoccidica attraverso l'alimentazione o l'acqua per almeno 3 settimane dopo la vaccinazione dei polli con questo prodotto, in caso contrario la replicazione corretta delle oocisti del vaccino, e di conseguenza lo sviluppo di un'immunità solida potrebbero essere compromesse. Inoltre, la durata dell'immunità dipende dall'ambiente che permette il riciclo delle oocisti, quindi deve essere tenuto presente che una decisione di utilizzare sostanze anticoccidiche nel periodo di 3 settimane dopo la vaccinazione debba essere presa tenendo in considerazione il potenziale impatto negativo sulla durata dell'immunità di questo prodotto. Conservare e trasportare il vaccino in frigorifero (2 °C-8 °C). Non congelare. Periodo di validità del medicinale veterinario confezionato per la vendita: 10 mesi. Periodo di validità dopo diluizione conformemente alle istruzioni: 10 ore. **CONFEZIONI:** scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® contenente 7 ml (1.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE® T contenente 50 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® contenente 35 ml (5.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE® T contenente 250 ml. Scatola di cartone con un flaconcino di EVANT® contenente 70 ml (10.000 dosi) e un flaconcino di HIPRAMUNE® T contenente 500 ml. **NUMERO DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** EU/2/18/233/001-003. **TITOLARE DELL'AUTORIZZAZIONE ALL'IMMISSIONE IN COMMERCIO:** LABORATORIOS HIPRA, S.A. Avda. La Selva, 135, 17170 Amer (Girona), Spagna. Tel. (34) 972 430660 - Fax (34) 972 430661. **RAPPRESENTANTE LOCALE:** Hipra Italia S.R.L., Via E. Mattei n. 2, 25030 Coccaglio (Brescia), ITALIA. Tel. (+39) 030 7241821, Fax (+39) 030 7700881. **CONDIZIONI PER LA DISTRIBUZIONE:** medicinale veterinario soggetto a prescrizione. **SOLO PER USO VETERINARIO. USARE I MEDICINALI RESPONSABILMENTE.**

LE UOVA POSSONO ESSERE
PIÙ ROBUSTE?



Con BACTOCELL,
riduci il numero degli **scarti!**

BACTOCELL è un batterio probiotico che ha costantemente dimostrato i suoi benefici nelle galline ovaiole.

Promuovendo l'integrità dell'intestino, **BACTOCELL** aiuta la formazione di gusci più robusti e riduce il numero degli scarti.

BACTOCELL
LACTIC ACID BACTERIA FOR MONOGASTRICS

Not all products are available in all markets nor associated claims allowed in all regions.

LALLEMAND ANIMAL NUTRITION ■ SPECIFIC FOR YOUR SUCCESS
www.lallemandanimalnutrition.com +39 327 4147 662 – Email: animalitaly@lallemand.com

LALLEMAND

**BAD THINGS
COME IN**



Con l'ampio spettro d'azione su tre diversi sierogruppi di Salmonella, Salenvac ETC di MSD Animal Health è il tuo nuovo partner per la protezione dei tuoi animali.

Nobilis®
SALENVAC® ETC

POULVAC®
E. coli

**PER I TUOI ANIMALI
PER LA SALUTE
PER TE**



zoetis™

Ottobre 2021
da Litografia La Ducale Srl - Parma

