

RT-PCR response perfectly to the requirements of identifying the H5 and H7 subtypes both for its precision and its speed (48 hours).

This technique could be a valid test in support of classical diagnosis at the same time being an efficient control technique of poultry breeding. It has been shown to be a sensitive and specific method both using homogenised organs and liquid allantoid.

## REFERENCES

Alexander D.J. 1993. Orthomyxovirus Infection In J.B. McFerran and M.S. McNulty (eds) Virus Infections of birds Elsevier Science Publishers B.V. pp. 287-316.

Easterday B.C., Hinshaw V.S., Halvorson D.A. 1997. Influenza. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, L.M. Saif (eds) Diseases of Poultry 10<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa pp. 583-605.

Fouchier Ron A.M., Bestebroer S.H., Van de Kemp L., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D. 2000. Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. Journal of Clinical Microbiological pp. 4096-4101.

Ming-Shiuh Lee, Poa-Chun Chang, Jui-Hung Shien, Ming-Chu Cheng, Happy K. Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcriptio-PCR. Journal of Virological Methods 97:13-22.

---

## 19) CORRELAZIONE ANTIGENICA TRA SIEROTIPO FA-6881/97 O AZ-27/98 E I CEPPI "IT-02" DEL IBV, ISOLATI PIÙ RECENTEMENTE IN EUROPA

**Antonio Zanella<sup>1</sup>, Raffaella Ceruti<sup>2</sup> e Luigi Gavazzi<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> Già Docente della Sez. di Microbiologia e Immunologia del Dip. di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano, via Celoria 10, Milano Italy

<sup>2</sup> Gruppo Amadori – Cesena

### Introduzione

A partire dal 1966 sono stati riportati numerosi isolamenti di nuovi sierotipi o varianti del IBV in Italia (1-9). Particolare attenzione è stata rivolta in passato al ceppo AZ-23/74, per la durata della sua prevalenza, circa vent'anni; successivamente il ceppo è apparentemente scomparso(7).

A partire dal 1997 ed in aree diverse del Paese, sono stati isolati due ceppi immunologicamente simili tra di loro, Fa-6881/97 ed AZ-27/98, da casi di grave nefrite in broiler o da sindrome respiratoria in pollastre. In seguito, nel giro di pochi anni, altri (oltre venti) ceppi di IBV strettamente simili dal punto di vista antigene ai precedenti, sono stati isolati in aree diverse del Paese da polli con manifestazioni respiratorie, enteriche e/o renali. Pertanto, tali ceppi, antigenicamente diversi dai sierotipi più noti, presentatisi sia in Europa che negli altri continenti, sono stati considerati come un nuovo sierotipo o variante, assai diffuso e prevalente in Italia (9).

Più recentemente, molti (oltre 100) ceppi di IBV, considerati simili al ceppo Fo-4682/99 e denominati anche "It-02", isolati in molti paesi dell'Europa occidentale sono stati riferiti durante l'International Symposium of Avian Coronavirus a Giessen, Germania.

Scopo di questa preliminare indagine è stato quello di rilevare eventuali correlazioni antigeniche tra gli isolati "It-02" ed il sierotipo rappresentato dai ceppi Fa-6881/97 o AZ-27/98.

### Materiali e metodi

Substrato. Uova embrionate SPF di 10 giorni.

Ceppi IBV. Ceppi Fa-6881/97, AZ-27/98 e 793/B della nostra collezione, al loro 12° passaggio e It-02 (o, meglio, FO-4682/99) gentilmente fornitoci dall' IZSLER, sez. Forlì al 5° passaggio; quest'ultimo è stato ripassato fino al 10° passaggio in uovo embrionato.

Antisieri specifici IBV. Antisieri Fa-6881/97, AZ-27/98 e 4/91 (793/B), ottenuti come previamente riportato (10) e antisiero It-02, gentilmente fornitoci da IZS delle Venezie.

Virus-Neutralizzazione (VN) test. I test VN sono stati eseguiti secondo il metodo-alfa, virus variante-siero costante (diluizione log<sub>10</sub> di virus e 1:5 di siero), metodo questo risultato più sensibile del metodo-beta (8).

Le miscele virus + sieri specifici, così come virus + siero negativo sono state tenute a contatto per 1 ora a 25°C e quindi inoculate, alla dose di 0.1ml in gruppi di 5 uova per diluizione, via cavità allantoidea. Speratura uova ogni giorno ed esame per mortalità e lesioni specifiche entro 8 giorni.  
Calcolo indici di neutralizzazione (NI) secondo il metodo di Reed e Muench.

### Risultati e considerazioni

I risultati vengono dettagliatamente riportati in tabella 1.

Questi risultati preliminari permettono di considerare i ceppi FA-6881/97 ed AZ-27/98 come i primi isolamenti di un nuovo sierotipo di IBV in Europa. Ad esso apparterebbero, o almeno sarebbero molto simili antigenicamente, anche i cosiddetti ceppi "It-02"; di questi ultimi il primo isolamento risalirebbe al 1999, come ceppo FO-4682/99 (Massi et al., comunicazione personale).

L'isolamento di molti ceppi "It-02", ristretto almeno per ora all'Europa occidentale, è stato di recente e ampiamente riportato all'International Symposium of Avian Corona- and Pneumovirus Infections, tenuto nel magnifico castello di Rauishholzhausen, Giessen, Germania, 20-23 giugno 2004 (in corso di stampa).

Ulteriori e più profonde indagini sono in corso presso l'IZSLER di Brescia e l'IZS delle Venezie, come la caratterizzazione molecolare e l'analisi filogenetica, con sequenziazione di parte del genoma, la subunità ipervariabile S1, di numerosi ceppi europei di IBV, inclusi i vari ceppi It-02, nonché i ceppi FA 6881/97 e AZ 27/98.

Al test RT-PCR, riportato in un precedente lavoro, il ceppo Fa-6881/97 sarebbe risultato correlato al ceppo 793/B, contrariamente ai risultati sierologici di SN crociata. Il ceppo AZ 27/98, nonostante la sua stretta affinità antigenica con FA-6881/98, non sarebbe invece risultato correlato né al 793/B né ad altri più comuni sierotipi del passato (10).

Anche se con il test RT-PCR e la sequenziazione, differenze possono essere state rilevate nella sequenza nucleotidica e conseguentemente in quella aminoacidica, ciò non esclude che, almeno parte degli isolati It-02 in questione, possano appartenere allo stesso sierotipo o variante Fa-6881/97 o AZ 27/98 e, conseguentemente, indurre una reazione immunologia crociata, sia *in vitro* che *in vivo*.

Concludendo pertanto, per stabilire la differenza tra un ceppo e l'altro non ci si può basare, a nostro avviso, solo sul genotipo, ma anche e forse di più, sulle caratteristiche antigeniche o immunogene, che dal punto di vista pratico (immunità) sono le più importanti.

Il genotipo potrà invece avere un maggiore significato o importanza, nello studio epidemiologico dell'infezione.

Ricerche sull'attenuazione e sua stabilizzazione del ceppo AZ 27/98, nonché la sua efficacia protettiva *in vivo* sono in corso con risultati apparentemente positivi.

Tabella 1: Test di virus-neutralizzazione crociata tra i ceppi correlati Fa-6881/97 e AZ-27/98 ed i ceppi 793 B e "It-02" del IBV.

VIRUS	ANTISIERO			
	Fa-6881/97	AZ-27/98	It-02	793 B or 4/91
Fa-6881/97	7,2	6,2	5,2	< 2,0
AZ-27/98	6,2	6,0	5,3	< 2,0
793 B or 4/91	2,7	2,2	n.d.*	5,2
It-02 or Fo 4682/99	5,0	5,0	6,0	< 2,0

Parte di questi risultati provengono da un lavoro pubblicato da Zanella A. *et al.*, Avian disease, 2003.

\*: n.d.= non eseguito.

### Bibliografia

Capua I., Gough R.E., Mancini M., Casaccia C., Weiss C. (1994). A "novel" infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. J Vet. Med B 41:83-89.

Pascucci S., Cordioli P., Giovanetti L. (19..). Characterization of a variant strain of infectious bronchitis virus. La Clinica Veterinaria, 109: 55-58.

Rinaldi A., Crespi A., Cervio G., & Mandelli G. (1966). Isolamento di un ceppo nefropatogeno del virus della bronchite infettiva del pollo. *Selezione Veterinaria*, 7: 284-287.

Zanella A., (1977). Bronchite infettiva nei polli da carne con particolare riferimento alle forme di nefrite-nefrosi. *La Clinica Veterinaria*, 100: 407-415

Zanella A., Guallini L., Morini M.T. (1967). Caratteristiche dei ceppi nefropatogeni del virus della bronchite infettiva aviare. *Atti SisVet.*, 21: 895-899.

Zanella A., Marchi R., Mellano D., Ponti V. (1988). Avian infectious bronchitis: nephropathogenic and respiratory virus isolates and their spreading in Italy. *Proc. Int. Symp. Infectious Bronchitis*. Giessen Germany, June 23-26, 1988, pp. 245-255

Zanella A., Martino P.A. (1998). Avian infectious bronchitis in Italy: persistence of nephropathogenic strains related to serotype AZ-23/74. *Proc. Int. Symp. Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry* Giessen Germany, June 15-18, 1998, pp. 189-197.

Zanella A., Coaro R., Lavazza A., Moreno Martin A. (2000). Avian Infectious Bronchitis: isolation of the new variant of virus and evaluation of the test of virus-neutralization. *La Selezione Veterinaria*, 2000: 1358-1365.

Zanella A., Coaro R., Fabris G., Marchi R., Lavazza A. (2000). Avian Infectious Bronchitis virus: isolation of an apparently new variant in Italy. *Veterinary Record*, 146: 191-193

Zanella A., Lavazza A., Marchi R., Moreno Martin A., Paganelli F. (2003). Avian Infectious Bronchitis: characterization of new isolates in Italy, *Avian Diseases*, 47: 180-185.

---

## 20) METHODS USED FOR THE CONTROL OF THE EFFICIENCY OF ANTICOCCIDIAL DRUGS

**BENZONI G., GRASTILLEUR D.**  
*EVIALIS INTERNATIONAL*

Corresponding author : Didier Grastilleur e-mail : [dgrastilleur@evialis.evls.net](mailto:dgrastilleur@evialis.evls.net)

### ABSTRACT

Studies about periodic control of the efficiency of the anticoccidial products against coccidiosis, efficiency of new products.

### INTRODUCTION

Coccidiosis is an old and recurrent problem for industrial poultry productions. Prevention is based on classical hygienic methods ( litter quality, disinfection of the floor ...) and chemical prevention by the use of authorised anticoccidial drugs.

The use of vaccines has recently developed but, though efficient, is still expensive and limited to gallus.

Chemical prevention is still the more commonly used one despite of its disadvantages ( possibility of cross contamination, withdrawing period ...). The number of possible drugs is more and more limited, even very limited for some productions and users have to develop methods in order to preserve the efficiency of the products ( shuttle programs, quick change over ). They also have to control the efficiency of the field programs by using methods such as oocysts count in the faeces at critical periods, control of the lesions, control of bodyweight ...

Additionally, screenings can also be done at the experimental station to control the efficiency of the products against coccidies from the field or from lab collections. This method can also be used to screen new vegetal products recently appeared on the market.

R et D department of EVIALIS group main missions are : to keep "up to date" the technical resources of the group, to find and develop new methods for its own researches, to find and develop new solutions and new products for animal productions. Its facilities for poultry researches are :

- Four houses that can be used for the different productions ( broilers, turkeys, ducks ...).
- A house with 96 roosters for digestibility studies.
- A house with individual cages for digestibility studies and screenings for broilers.