

## **INFLUENZA DELLA COLONIZZAZIONE INTESTINALE DA *BRACHYSPIRA* SPP. SULLO STATO SANITARIO E SULLE PERFORMANCE PRODUTTIVE DI OVAIOLE COMMERCIALI**

Bano L.<sup>1\*</sup>, Trevisiol K.<sup>2</sup>, Tonon E.<sup>1</sup>, Ferro T.<sup>1</sup>, Furlan G.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>

1 *IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso*

2 *IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Bolzano, Via Bivio 59, 39100 Kaiserau, Bolzano*

\*Corresponding Author. Email: [lbano@izsvenezie.it](mailto:lbano@izsvenezie.it), Tel: +39 0422 302 302

### **Summary**

The present survey was designed to evaluate the prevalence of intestinal spirochaetes and disease association in Italian laying hen flocks. For these purposes fresh caecal faeces were collected in 34 farms and 74 sheds located in leading Italian egg-producing regions. Faecal samples were tested by means of PCR protocols and bacteriological examination for the presence of *Brachyspira* spp. and results were related to clinical signs, production problems, age and housing system. Intestinal spirochaetes were detected in 68.7% of the evaluated farms with both diagnostic methods (direct PCR from faeces and bacteriological examination). Intestinal spirochaetes known to be pathogenic for chicken (*B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*) were detected in 37.5% and 46.8% of the farms tested by PCR and bacteriological examination respectively.

Intestinal spirochaetes were detected by PCR in significantly more sheds of chickens > 40 weeks of age (29/53 sheds, 54.7%) than in those ≤ 40 weeks of age (6/21 sheds, 28.5%) (P= 0.042).

There was a significant association (P=0.022) between colonization with spirochaetes and the occurrence of enteric disorders such as malabsorption, pasty vents and production of faeces stained eggshells. A significant association was observed also between reduced egg production and infection by intestinal spirochaetes (P=0.014) particularly when pathogenic species are considered (P=0.002). The egg drop was quantified in a variable percentage included between 3% and 9%. The highest prevalence was observed in free-range flocks (9/13) and in flocks hosted in sheds with scrapers used as manure removal system (4/4). All flocks hosted in the new enriched EU approved cages tested negative for intestinal spirochaetes (0/5). This study indicates that infections with avian intestinal spirochaetes are a common but probably under-estimated cause of enteric disorders and production problems in Italy.

### **INTRODUZIONE**

La spirochetosi intestinale aviaria (AIS) è una patologia causata da batteri Gram negativi, spiraliformi, appartenenti al genere *Brachyspira*. Nel pollame sono state segnalate 7 diverse specie di *Brachyspira* spp., ma attualmente solo tre sono ritenute in grado di causare la malattia: *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli* (McLaren *et al.*, 1997). Tra il pollame allevato la malattia è stata descritta in galline

ovaiole, polli riproduttori (Swine e McLaren, 1997), tacchini da carne (Shivaprasad e Duhamel, 2005), faraone (Bano 2007, osservazione personale) e oche (Names *et al.*, 2006). AIS è associata alla comparsa di sintomi enterici e a problemi produttivi la cui gravità varia a seconda della specie di *Brachyspira* implicata e del grado di colonizzazione. In gruppi di galline ovaiole affette da AIS è stata riportata diarrea cronica, aumento del contenuto idrico e lipidico nelle feci, ritardo dell'inizio della deposizione, riduzione della produzione d'uova e aumento della percentuale d'uova con guscio imbrattato da feci (Griffiths *et al.*, 1987, Dwars *et al.*, 1989, Dwars *et al.*, 1992, Swayne *et al.*, 1992, Trampel *et al.*, 1994). L'aumento del contenuto idrico nelle feci si ripercuote sullo stato della pollina (galline in gabbia) o della lettiera (galline a terra) con problematiche legate all'emissione di odori, pulizia dell'ambiente e aumento di mosche in allevamento (Phillips *et al.*, 2005).

Dato che la sintomatologia clinica e i problemi produttivi legati alla presenza di spirochete intestinali sono aspecifici, questa patologia è spesso sottodiagnosticata negli allevamenti da reddito. Ad oggi è stato condotto solo uno studio sulla prevalenza di spirochete intestinali in Italia ed ha riguardato allevamenti di ovaiole situati in provincia di Treviso. Tale indagine ha evidenziato una prevalenza pari al 34,4% riferita a spirochete intestinali patogene per il pollame (Bano *et al.*, 2008).

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di un'indagine sulla diffusione di spirochete intestinali condotta in alcuni allevamenti commerciali di galline ovaiole campionati nelle tre regioni italiane a maggiore vocazione avicola: Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna. Inoltre sono state indagate anche gruppi di ovaiole free-range situati in provincia di Bolzano.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

L'indagine si è svolta in 74 capannoni afferenti a 32 allevamenti da reddito di galline ovaiole, distribuiti in Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna. In ciascun capannone sono stati raccolti almeno 50 g di feci ciecali di recente emissione, conferiti entro 8 ore dal prelievo al laboratorio di Treviso, e qui processati per la ricerca di spirochete intestinali mediante esame batteriologico e PCR. In 45 capannoni gli animali erano stabulati in gabbia: 30 con nastro trasportatore per l'allontanamento delle feci, 6 con fossa profonda per lo stoccaggio delle deiezioni e 4 con raschiatori posti al di sotto delle gabbie. Cinque gruppi di animali erano ospitati in gabbie arricchite strutturate secondo le indicazioni riportate nelle recenti norme europea in materia di benessere animale. 29 gruppi erano allevati a terra e di questi 13 erano free-range, 15 erano allevati su pavimento fessurato e 1 su lettiera convenzionale. Al momento del campionamento, per ciascun capannone veniva compilata una scheda anamnestica con indicazioni riguardanti l'età, la numerosità, l'eventuale esecuzione di trattamenti con antimicrobici nei 20 giorni precedenti il prelievo e la presenza di sintomi o di problemi produttivi compatibili con AIS.

### *Isolamento ed identificazione*

Da ciascun pool di feci sono stati condotti 2 esami batteriologici in terreno selettivo per spirochete intestinali BAM (Calderaro *et al.* 2001), supplementato con globuli rossi di montone. Le piastre sono state incubate a 37 °C in condizioni d'anaerobiosi e ispezionate ogni 48 ore fino al decimo giorno. La presenza di corpi batteri

morfologicamente riferibili a spirochete intestinali è stata valutata mediante esame microscopico in immersione e contrasto di fase.

In caso di presenza di corpi batterici morfologicamente compatibili con quelli di spirochete intestinali, le colture venivano isolate in purezza e sottoposte ad identificazione di genere e specie mediante protocolli di PCR precedentemente pubblicati o attraverso sequenziamento condotto sul 16SrRNA (Rohde *et al.*, 2002; La *et al.*, 2003; Phillips e Hampson, 2005; Weissenböck *et al.*, 2005).

#### *Ricerca Brachyspira spp. dalle feci tramite PCR*

Da ciascun campione fecale il DNA veniva estratto impiegando un estrattore automatico (Microlab Star<sup>LET</sup>, Hamilton) e il kit d'estrazione Mag Max<sup>TM</sup> Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). La presenza di *Brachyspira* spp. nelle feci è stata indagata attraverso protocolli di PCR precedentemente descritti (La *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2002).

#### *Analisi statistica*

La presenza di spirochete intestinali nei vari gruppi analizzati è stata messa in relazione alla numerosità degli animali e al sistema di stabulazione degli animali impiegando il test di Fischer. Il test  $\chi^2$  è stato impiegato per studiare eventuali correlazioni fra infezione ed età del gruppo, e fra disturbi gastrointestinali e problemi produttivi. Riguardo alla numerosità in allevamento e all'età degli animali, i gruppi sono stati stratificati in 2 macrocategorie per ciascuna variabile: soggetti d'età  $\leq 40$  settimane e  $> 40$  settimane; gruppi con numero di animali  $\leq 20.000$  e  $> 20.000$ .

La sintomatologia e i problemi produttivi sono stati indagati anche rispetto alla presenza di spirochete intestinali ritenute patogene per il pollo (*B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli*).

## **RISULTATI**

La diffusione di spirochete intestinali negli allevamenti campionati è riportata in tabella 1.

La percentuale di allevamenti risultati positivi mediante esame colturale è risultata uguale a quella ottenuta mediante PCR, quest'ultima, tuttavia, ha permesso di individuare un maggior numero di capannoni positivi.

Gli allevamenti e i capannoni risultati positivi ad almeno uno dei 2 test sono stati rispettivamente il 75% e il 58% del totale. In 14 dei 35 gruppi risultati positivi mediante PCR non è stato possibile risalire sino all'identificazione di specie ma solo al genere *Brachyspira*. Otto gruppi sono risultati contemporaneamente infetti da 2 diverse specie di *Brachyspira* e 4 addirittura da 3 specie. Tramite esame batteriologico sono stati isolati in tutto 47 ceppi. Di questi 17 (36,3%) sono stati identificati come *B. innocens*, 1 (2,1%) come *B. murdochii*, 11 (23,4%) come *B. intermedia*, 14 (29,8%) come *B. pilosicoli*, 2 (4,2%) come *B. alvinipulli* e 2 (4,2%) non sono stati identificati.

La positività per spirochete intestinali è risultata superiore in gruppi d'età  $> 40$  settimane (29/53, 54,7%) rispetto a gruppi più giovani (6/21, 28,5%) e tale differenza si è rivelata statisticamente significativa ( $P=0.042$ ).

La percentuale di positività per *Brachyspira* spp. riscontrata in gruppi con meno di 20.000 soggetti e in gruppi più numerosi è stata pari al 49% (27/55) e al 21%

(4/19) rispettivamente. L'infezione non appare legata in modo statisticamente significativo alla numerosità del gruppo ( $P= 0.057$ ).

Al contrario è stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra infezione da *Brachyspira* spp. e sintomi enterici quali diarrea, aumento del contenuto idrico delle feci ed elevato numero di uova con guscio imbrattato ( $P = 0.022$ : 22/41 gruppi infetti con sintomi rispetto a 9/33 gruppi positivi senza sintomatologia).

Tra i 20 gruppi in cui veniva segnalato un calo dell'ovodeposizione, 13 (65%) sono risultati positivi rispetto ai 18/54 (33%) gruppi positivi in cui tale problematica non era stata osservata. Il calo di deposizione, che veniva segnalato in un intervallo variabile tra 3% e 9%, appare legato in modo statisticamente significativo all'infezione. Tale legame risulta ancor più rafforzato qualora vengano considerate solo le specie patogene per il pollame (*B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli*) ( $P= 0,002$ ). Per quanto riguarda il sistema di stabulazione, i risultati vengono riportati in tabella 2. I gruppi free-range e quelli allevati su pavimentazione fessurata sono apparsi maggiormente a rischio di contrarre l'infezione rispetto ai gruppi allevati in gabbia o voliera, ad eccezione di quelli ospitati in capannoni in cui viene utilizzato il raschiatore per l'allontanamento delle feci.

## DISCUSSIONE

Nel presente studio il 68,7% degli allevamenti di ovaiole analizzato è risultato positivo a *Brachyspira* spp. e il 46,8% a specie ritenute patogene per il pollame, confermando i dati acquisiti nel corso di una precedente indagine condotta in provincia di Treviso (Bano *et al.*, 2008).

Non sono state osservate differenze significative tra i risultati ottenuti impiegando i due differenti metodi diagnostici, anche se l'esame colturale ha permesso di risalire all'identificazione di specie in un numero superiore di campioni rispetto alla PCR diretta. La specie più frequentemente isolata è stata *B. innocens* (36,3%) seguita dalle due specie patogene *B. pilosicoli* (29,8%) e *B. intermedia* (23,4%). Tramite sequenziamento genico 2 ceppi sono stati identificati come *B. alvinipulli*, una specie patogena mai segnalata prima d'ora al di fuori degli Stati Uniti.

L'infezione da spirochete intestinali si conferma legata a disturbi dell'apparato gastroenterico che comportano sostanzialmente un aumento del contenuto idrico delle deiezioni e, di conseguenza, di uova con guscio imbrattato da feci. Tuttavia potrebbe risultare difficoltoso per i produttori associare un modesto incremento idrico nelle feci a tale patologia per 2 ragioni: innanzitutto perché l'aumento potrebbe essere causato da fattori legati alla composizione della razione e secondo perché la spirochetosi aviare è una patologia poco nota nel nostro paese, al contrario di quanto avviene in altri paesi ad avicoltura avanzata.

I risultati ottenuti sottolineano l'importanza economica della patologia che appare associata a un decremento della produzione di uova variabile tra il 3% e il 9%, in accordo con studi precedenti (Trampel *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1998). Tale associazione assume maggiore rilevanza in presenza di spirochete intestinali patogene, e ciò conferma l'importanza dell'identificazione di specie degli isolati a fini diagnostici

I gruppi d'età superiore alle 40 settimane hanno dimostrato un tasso d'infezione quasi doppio (54,7%) rispetto a gruppi più giovani (28,5%). Tale osservazione

è in accordo con studi precedenti e indica il fatto che il protrarsi della carriera produttiva espone il gruppo ad un rischio maggiore di contrarre l'infezione (Stephens e Hampson, 1999; Bano *et al.*, 2008).

La numerosità degli animali non appare legata in modo significativo all'infezione, anche se i gruppi più piccoli si sono dimostrati più frequentemente infetti (27/55) rispetto a quelli di dimensioni superiori (4/19). Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che solitamente i gruppi meno numerosi sono tenuti in condizioni d'allevamento più a rischio (free-range o allevamenti "a terra").

## CONCLUSIONI

In conclusione la colonizzazione di gruppi di ovaiole da parte di spirochete intestinali appare molto diffusa in Italia anche se risulta spesso sottodiagnosticata; ciò a causa dell'aspecificità dei sintomi e forse anche di una scarsa conoscenza della malattia. L'età avanzata dei gruppi e i sistemi di stabulazione a terra (su grigliato o free-range), espongono gli animali a rischi maggiori di contrarre l'infezione rispetto ai gruppi allevati in gabbia dove le deiezioni vengono allontanate con maggiore frequenza. Il presente studio conferma come la spirochetosi intestinale aviaria possa avere un impatto economico importante per l'allevamento della gallina ovaiole.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bano L., Merialdi G., Bonilauri P., Dall'Anese G., Comin D., Capello K., Cattoli G., Sanguinetti V., Agnoletti F. (2008). Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol.*, 37(3):281-286.
2. Calderaro, A., Merialdi, G., Perini, S., Ragni, P., Guegan, R., Dettori, G. & Chezzi, C. (2001). A novel method for isolation of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Veterinary Microbiology*, 80, 47-52.
3. Dwars R.M., Smit H.F., Davelaar F.G., Veer W., Van T. (1989). Incidence of spirochaetal infections in cases of intestinal disorder in chickens. *Avian Pathol.* 18, 591-595.
4. Dwar R.M., Davelaar F.G., Smit H.F. (1992). Influence of infection with avian intestinal spirochaetes on the faeces of laying hens. *Avian Pathol.* 21, 427-429.
5. Griffiths I.B., Hunt B.W., Lister S.A., Lamont M.H. (1987). Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with egg production in pullets. *Vet. Rec.* 121, 35-37.
6. La T., Phillips N. D., Hampson D. J. (2003). Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J Clin Microbiol.* 41(7): 3372-3375.
7. McLaren A.J., Trott D.J., Swayne D.E., Oxberry S.L., Hampson D.J. (1997). Genetic and phenotypic characterisation of intestinal spirochetes colonizing chickens, and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J. Clin. Microbiol.* 35, 412-417.
8. Nemes C. S., Glavits R., Dobos-Kovacs M., Ivanics E., Kaszanyitzky E., Beregszaszi A., L. Szeredi L., Dencso L. (2006). Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks. *Avian Pathol.*, 35(1):4-11.
9. Phillips N. D., La T., Hampson D. J. (2005). A cross-sectional study to investigate

- the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. *Veterinary Microbiology*, 105:189-198.
10. Rohde J., Rothkamp A., Gerlach G. F. (2002). Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel PCR – based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 40: 2598-2600.
  11. Shivaprasad H. L., Duhamel G. E. (2005). Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial Turkeys. *Avian Dis.*, 49(1):609-613.
  12. Smith H.F., Dwars R.M., Davelaar F.G., Wijtten A.W. (1998). Observations on the influence of intestinal spirochaetosis in broiler breeders on the performance of their progeny and on egg production. *Avian Pathology*, 27, 133\_141.
  13. Swayne D.E., McLaren A.J. (1997). Avian intestinal spirochaetes and intestinal spirochaetosis. In: Hampson, D.J., Stanton, T.B. (Eds.), *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. CABI Press, Wallingford, pp. 267–300
  14. Swayne D.E., Bermudez A.J., Sagartz J.E., Eaton K.A., Monfort J.D., Stoutenberg J.W., Hayes J.R. (1992). Association of cecal spirochaetes with pasty vents and dirty eggshells in layers. *Avian Dis.* 36, 776–781.
  15. Trampel D.W., Jensen N.S., Hoffman L.J., 1994. Cecal spirochaetosis in commercial laying hens. *Avian Dis.* 38, 895–898.
  16. Weissenböck H. Maderner A., Herzog A. M., Lussy H., Nowotny N. (2005). Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet Mic*, 111:67-75.

	PCR dalle feci				Esame batteriologico			
	<i>Brachyspira</i> spp.		Specie patogene		<i>Brachyspira</i> spp.		Specie patogene	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
<b>Aziende</b>	22/32	68,7	12/32	37,5	22/32	68,7	15/32	46,8
<b>Capannoni</b>	35/74	47,2	18/74	24,3	31/74	41,9	20/74	27

**Tabella 1.** Aziende e capannoni risultati positivi per *Brachyspira* spp. e per spirochete patogene mediante PCR dalle feci ed esame batteriologico.

	<i>Gabbie con nastro</i>	<i>Fossa profonda</i>	<i>Gabbie con raschiatori</i>	<i>Gabbie UE</i>	<i>Pavimento fessurato</i>	<i>Free range</i>	<i>Lettieria convenzionale</i>
POS	9	2	4	0	8	9	0
NEG	21	4	0	5	7	4	1
TOT	30	6	4	5	15	13	1

**Tabella 2.** Positività a *Brachyspira* spp. in relazione al sistema di stabulazione/rimozione delle deiezioni adottato nel capannone