

APPROFONDIMENTI DIAGNOSTICI SU CASI DI PROVENTRICOLITE IN POLLI DA CARNE

Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Barbieri I., Casadio M., Massi P.

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna -

Summary

A proventriculitis syndrome (associated to a malabsorption syndrome) in a multi age organic broiler farm was observed. Clinical signs and gross lesions were detected between 19 and 38 days of age. The same symptoms and lesions were also observed in the previous production cycle. In younger groups (19 and 24 days of age), the enteric lesions were most prominent and Reovirus and Rotavirus were observed using Electron Microscopy. At 31 and 38 days of age proventriculitis lesions were more evident. At 31 days of age the PCR and the RT-PCR revealed an infection caused by fowl adenovirus serotype 2 (in liver and intestine) and Enterovirus-like particles were observed by Electron Microscopy. At 38 days of age a mixed infection caused by Fowl Adenovirus serotype 2 (FAV2), in the proventriculus, intestine and liver and Reovirus, in the intestine, was detected using PCR and RT-PCR. Other viruses (such as Birnavirus, Infectious Bronchitis Virus, Chicken Infectious Anemia Virus and Infectious Bursal Disease), bacterial infections and mycotoxins were not involved in the observed cases

INTRODUZIONE

Con il termine Proventricolite si intende un processo infiammatorio caratterizzato da dilatazione ed ispessimento della parete dello stomaco ghiandolare. Tale lesione viene spesso osservata nel quadro di sindromi da malassorbimento. Numerosi agenti infettivi (Adenovirus, Reovirus, Virus della Bronchite Infettiva e della Bursite infettiva) e non infettivi (amine biogene, micotossine, basso contenuto di fibra alimentare o eccesso di solfato di rame), sono stati associati a questa sindrome, tuttavia, nessuna tra queste cause è stata costantemente messa in rilievo nel determinismo delle lesioni al proventriglio. Scopo del presente lavoro è descrivere un percorso diagnostico applicato ad un caso di sindrome da malassorbimento e grave Proventricolite osservata in un allevamento di Broiler.

MATERIALI E METODI

Nel mese di marzo 2014 sono stati conferiti presso la Sezione diagnostica di Forlì dell'IZSLER, 40 polli da carne (Ross 708) in parte morti e in parte soppressi in allevamento, distinti in quattro sub-campioni da 10 soggetti ciascuno di diverse età, (19 giorni, 24 giorni, 31 giorni e 38 giorni) per i quali il veterinario aziendale riferiva mortalità (4%) e formazione di scarti (10%) soprattutto nei soggetti di età compresa tra i 15 e 30 giorni di vita. Veniva inoltre segnalato un calo medio del peso vivo alla macellazione del 10% rispetto alla norma ed un peggioramento della qualità della lettiera. Gli animali risultavano vaccinati in incubatoio per Malattia di Marek, Malattia di Gumboro, Malattia di NewCastle e Bronchite Infettiva. Unico trattamento con Tilosina tra i 7 e 10 giorni di vita. Un percorso diagnostico era stato avviato tra dicembre e gennaio su animali di 20 e 40 giorni di vita, provenienti dalla stessa azienda, con dati produttivi e andamento clinico sovrapponibili.

Tipologia di allevamento: azienda organizzata in tre capannoni a ventilazione naturale, ciascuno di 1000 m²; l'interno del capannone suddiviso in "capannine" nelle quali vengono allevati i Broiler linea Bio OGM Free; nello stesso capannone, all'interno di capannine dedicate, sono allevati anche piccoli gruppi di faraone. Ogni capannina contiene 600 femmine, gli accasamenti vengono effettuati con frequenza settimanale. Il vuoto sanitario viene inteso per capannina, così come avviene per gli accasamenti. La macellazione avviene tra i 35 e 40 giorni.

Indagini di laboratorio

- Esami anatomo-patologici
- Esami batteriologici
- Indagini biomolecolari

I campioni di proventriglio intestino e fegato sono stati sottoposti alle seguenti PCR specifiche per Reovirus, Fowl Adenovirus (FAV) e Birnavirus:

- Ricerca di Fowl Adenovirus (FAV): è stata eseguita una PCR che amplifica un frammento di 114bp dell'ORF20A del genoma di fowl adenovirus secondo il protocollo previsto da Romanova et al., 2009 con le seguenti modifiche: il DNA è stato amplificato allestendo la mix di reazione in 25µl totali contenenti: 250nM di ogni primer (forward 5'-ATGGTGTCTATTGGACGCA-3', reverse 5'-TGTTTGGATGTTGCACCTTT-3'), 12,5µl di GoTaq Hot Start Colorless Master mix (Promega) e 5 µl di DNA estratto. Profilo di amplificazione: attivazione TaqHot start 95°C per 2 minuti seguita da 35 cicli a 95°C per 45 secondi, 52°C per 45 secondi e 72°C per 45 secondi con estensione finale a 72°C per 5 minuti.
- Ricerca di Reovirus: è stata eseguita una RT-PCR secondo il protocollo previsto da Pantin-Jackwood et al., 2008. La reazione di RT-PCR, è stata allestita utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®), e primer specifici per una porzione di 1120 bp del gene S4. In particolare, in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 1µM di ogni primer (S4-F13 5'-GTGCGTGTGGAGTTTCCCG-3', S4-R1133 5'-TACGCCATCCTAGCTGGA-3'), 5µl di 5X Onestep RT-PCR Buffer, 0.4nM di ogni dNTP, 12.5U di inibitori delle Rnasi, 1µl di OneStep RT-PCR enzyme mix e 5µl di estratto di RNA. Profilo di amplificazione: 1 X (50°C, 30 min), 1 X (94°C, 15 min), 40 X (94°C, 30 sec; 50°C, 30sec, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 10 min).
- Ricerca di Birnavirus: è stata eseguita una RT-PCR che amplifica un frammento di 170bp del gene VP1 (Guy et al, 2011). La retrotrascrizione è stata eseguita mediante kit Affinity Script Multiple Temperature c-DNA Synthesis kit (Stratagene) secondo le indicazioni della ditta produttrice. Il cDNA è stato poi amplificato allestendo la mix di reazione in 25µl totali contenenti: 500nM di ogni primer (B2F 5'-CGTAGACCTCGTCCTTCTGC-3', B2R 5'-GGGCGGTAACCATTCAGATA-3'), 12,5µl di GoTaq Hot Start Colorless Master mix (Promega) e 5 µl di cDNA. Profilo di amplificazione: attivazione TaqHot start 95°C per 2 minuti seguita da 40 cicli a 95°C per 45 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 1 minuto con estensione finale a 72°C per 7 minuti.

- Microscopia elettronica ME (colorazione negativa, tecnica ultracentrifugazione)
- Sequenziamento genico

I prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers dell'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye Terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500xl (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASar) e sottoposte a ricerca blast. Le sequenze sono poi state confrontate tra loro e con sequenze di riferimento disponibili in GenBank mediante allineamento multiplo e successiva costruzione di un dendrogramma con il metodo Neighbour-joining con il programma MEGA 5.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Esame anatomopatologico

Nei soggetti più giovani (19 giorni), è stato osservato un quadro prevalentemente enterico con enterite catarrale ed esiti di malassorbimento (ossa gombose, difformità di sviluppo) ingestione di alimento misto a lettiera, pellicola dello stomaco muscolare in alcuni tratti di aspetto ipercheratosico e parzialmente erosa. Nei soggetti di 24 giorni sono state osservate lesioni analoghe ma tendenzialmente più gravi con lieve ipertrofia dello stomaco ghiandolare e del fegato. Nei soggetti di 31 giorni sono state osservate gravi lesioni a carico del fegato di aspetto iperplastico, con esiti di stasi e principio di fenomeni degenerativi, proventriglio notevolmente aumentato di volume e spessore, edematoso nella zona sub-follicolare, materiale bianco lattiginoso all'interno dei follicoli ghiandolari fortemente iperplastici ed emorragici. L'intestino presentava una lieve enterite catarrale, meno grave rispetto a quanto osservato negli animali più giovani. Infine nei soggetti di 38 giorni sono state riscontrate lesioni simili a quelle osservate a 31 giorni, leggermente più gravi a livello di proventriglio. In sintesi le lesioni anatomopatologiche evidenziate nei soggetti più giovani erano suggestive di un quadro enterico, mentre per i soggetti di maggior età, l'esame anatomopatologico ha confermato un'attenuazione della forma enterica con lesioni localizzate a livello proventricolare.

Esami Batteriologici

Non hanno messo in evidenza agenti patogeni

Indagini Biomolecolari, microscopia elettronica (ME) e Sequenziamento Genomico

I risultati delle indagini condotte sono sintetizzati nella Tabella 1 in cui sono confrontati gli esiti delle diverse prove sui campioni.

In particolare nei soggetti di età compresa tra **19 e 24 giorni** le analisi in PCR e ME hanno mostrato la presenza di Reovirus (PCR) e Rotavirus (ME). Nei soggetti di **31 giorni**, con quadro anatomopatologico suggestivo di proventricolite, le indagini di laboratorio hanno dimostrato la presenza di Adenovirus (FAV) in PCR da intestino e fegato. La presenza di Adenovirus è stata inoltre confermata in ME che ha messo, inoltre, in evidenza la presenza di particelle Enterovirus-like nell'intestino. Nei soggetti di **38 giorni**, con lesioni proventricolari maggiormente evidenti, i campioni di intestino, proventriglio e fegato sono tutti risultati positivi alla PCR per Adenovirus, la cui presenza è stata confermata anche in ME. I campioni di intestino sono inoltre risultati positivi alla PCR Reovirus.

La PCR per Birnavirus è risultata negativa su tutti i campioni analizzati. Non sono state effettuate indagini per micotossine dal mangime, per Bronchite Infettiva, Anemia infettiva e Malattia di Gumboro, in quanto già escluse come causa di malattia in conferimenti precedenti.

Al fine di confermare l'identificazione dei ceppi virali, i campioni positivi in PCR per Reovirus e Adenovirus, sono stati sottoposti a sequenziamento. Per gli Adenovirus sono stati sequenziati campioni da fegato e proventriglio. (Figura 2), L'analisi delle sequenze ottenute ha dimostrato la completa identità nucleotidica di tutti i campioni che risultano maggiormente correlati ad un ceppo di ADV di sierotipo 2 con cui mostrano il 98.2% di identità nucleotidica (Figura 2).

Il sequenziamento dei campioni di Reovirus ha rivelato un'identità nucleotidica del 93% verso il ceppo di ARV da pollo /Kr/ADL112782 per il campione di intestino dal soggetto a 24 gg e una identità nucleotidica dell'88% verso il ceppo ARV da pollo T178-1 in Blast. Il confronto delle sequenze ottenute e con sequenze di riferimento da GenBank è mostrato in Figura 3. Nell'analisi sono state incluse anche due sequenze di Reovirus ottenute da campioni di intestino prelevati precedentemente da soggetti provenienti dalla stessa azienda con lesioni suggestive di enterite virale, analizzati dal laboratorio tra dicembre e gennaio. Nel dendrogramma si nota l'esistenza di una possibile maggior correlazione tra la sequenze 62128 corrispondente al soggetto di 38 gg di Marzo 2014 e la sequenza del soggetto di pari età (40gg) relativo al conferimento del Dicembre 2013 che, pur mostrando una non elevata identità nucleotidica tra loro (85%) risultano molto più diversi agli altri campioni provenienti da animali di età inferiore.

Tabella1: indagini Biomolecolari e Microscopia Elettronica (ME) e Sequenziamento Genico

Età degli animali	organi	PCR REOV	PCR ADEV	PCR BIRNAV	ME	SEQUENZIAMENTO Identità nucleotidica in Blast
19 gg	intestino	P	N	N	P Rotavirus	Reovirus (non seq)
	fegato	N	N	/	/	/
	proventriglio	N	N	N	N	/
24 gg	intestino	P	N	N	P Enterovirus like	Reovirus (Dendrogramma) 93% vs ARV-ck/Kr/ADL112782 KC593433
	fegato	N	N	/	N	
	proventriglio	N	N	N	N	
31 gg	intestino	N	P	N	P Enterovirus like	Adenovirus (non seq)
	fegato	N	P	/	/	Adenovirus 92.8% vs ADV2 (EF458160) (Dendrogramma)
	proventriglio	N	N	N	/	/
38 gg	intestino	P	P	N	P Adenovirus	Reovirus /Adenovirus (Dendrogramma-Reo) 88% vs ARV-ck/T178 (KC865795)1
	fegato	N	P	N	/	Adenovirus (non seq)
	proventriglio	N	P	N	N	Adenovirus 92.8% vs ADV2 (EF458160) (Dendrogramma)

Figura 2: Dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale della orf20A dei campioni di *Adenovirus* oggetto dello studio che mostrano una identità nucleotidica del 98.2% verso una sequenza di ADV2.▲: sequenze di riferimento sierotipi 1, 2, 5, 8 e 9 disponibili in GenBank

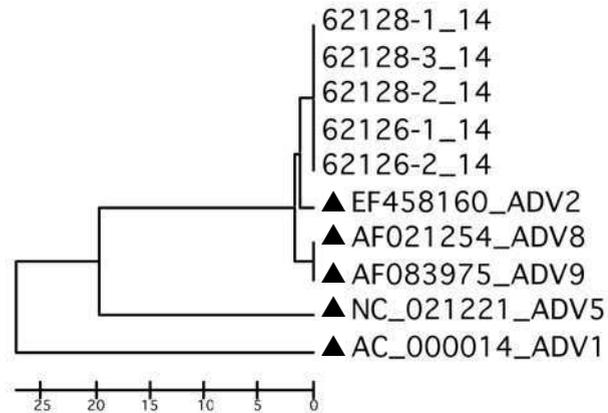
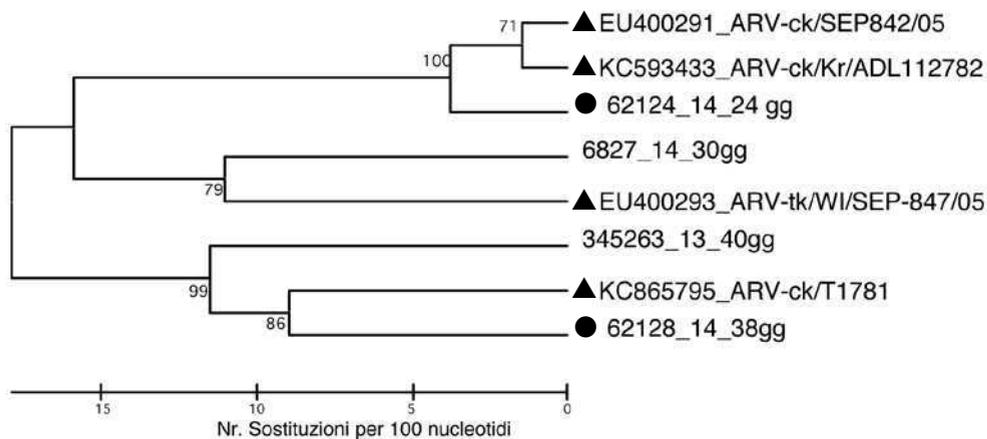


Figura 3: Dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del Segmento S4 del genoma dei ceppi di Reovirus. Le sequenze dei campioni oggetto dello studio (●) sono confrontate con due sequenze di reovirus ottenute da campioni di intestino prelevati da soggetti provenienti dalla stessa azienda, con lesioni suggestive di enterite virale, analizzati dal laboratorio tra dicembre e gennaio.e con (▲) lesequenze di riferimento disponibili in GenBank(▲) .



CONCLUSIONI

Sulla base delle risultanze degli esami antomo-patologici, di PCR e diME è stato possibile confermare il sospetto diagnostico di enterite virale nei soggetti di età compresa tra **19 e 24 giorni**.

Nei soggetti di **31 giorni**, con quadro anatomopatologico suggestivo di proventricolite, le indagini di laboratorio hanno dimostrato la presenza di Adenovirus (FAV) in PCR da intestino e fegato, la ME ha confermato la presenza di Adenovirus con l'ulteriore riscontro della presenza di Enterovirus like da intestino. Nei soggetti di **38 giorni**, con lesioni proventricolari maggiormente evidenti, i campioni di intestino, proventriglio e fegato sono tutti risultati positivi alla PCR Adenovirus, confermati in ME. I campioni di intestino sono inoltre risultati positivi alla PCR Reovirus. I risultati delle analisi effettuate sui soggetti di età maggiore pertanto suggeriscono un'evoluzione della malattia anche in termini di diffusione dell'agente patogeno nei vari organi. Il sequenziamento del campione risultato positivo per ADV indica una correlazione con un ceppo ADV di Sierotipo 2. Purtroppo non sono disponibili dati diagnostici sulle faraone presenti nello stesso ambiente di allevamento, ma sarebbe auspicabile un confronto tra i virus isolati dal pollo e dalle stesse faraone.

Più complessa è l'interpretazione del sequenziamento per Reovirus per cui l'analisi di sequenza ha evidenziato la presenza di quattro sequenze diverse scarsamente correlate tra loro ad eccezione delle due sequenze ottenute dai soggetti della stessa età (38-40gg), ma appartenenti a due cicli produttivi diversi .

Lo studio condotto ha evidenziato una correlazione diretta tra lesioni anatomopatologiche proventricolari e riscontro eziologico da FAV sierotipo 2, la presenza di faraone nello stesso ambiente di allevamento potrebbe aver avuto un ruolo importante nel determinismo della malattia, ma ciò non è stato dimostrato. Nonostante siano frequentemente osservati episodi di malattia riconducibili a proventricolite, l'eziologia (infettiva o non infettiva), rimane un aspetto non ancora del tutto chiarito. Per questo motivo, sarebbe auspicabile implementare ed approfondire studi di prevalenza e indagini di laboratorio su questa sindrome.

BIBLIOGRAFIA

- Dandár E, Bálint A, Kecskeméti S, Szentpáli-Gavallér K, Kiszfali P, Melegh B, Farkas SL, Bányai K. (2013). Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from a broiler chicken with central nervous system disease. Arch Virol.2013 Dec;158(12):2583-8. doi: 10.1007/s00705-013-1739-y. Epub 2013 Jun 16.
- Guy JS, West AM, Fuller FJ. (2011). Physical and genomic characteristics identify chicken proventricular necrosis virus (R11/3 virus) as a novel Birnavirus. Avian Dis. 55(1): 2-7.
- Koo BS, Lee HR, Jeon EO, Han MS,Min KC, Lee SB,Mo IP. (2013). Molecular survey of enteric viruses in commercial chicken farms in Korea with a history of enteritis. Poult Sci_ 2013 Nov;92(11):2876-85. doi: 10.3382/ps.2013-03280.
- Jiang P, Ojkic D, Tuboly T, Huber P, Nagy É. (1999). Application of the polymerase chain reaction to detect fowl Adenoviruses. Can. J. Vet. Res. 63:124-128.

- Lenz SD, Hoerr FJ, Ellis AC, Toivio-Kinnucan MA, Yu M. (1998). Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and *Reoviruses* isolated from broiler chickens in Alabama. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 145-151.
- Ottiger HP. (2010). Development, standardization and assessment of PCR systems for purity testing of avian viral vaccines. *Biologicals.* 38: 381-388.
- Pantin-Jackwood MJ, Day JM, Jackwood MW, Spackman E. (2008). Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian Dis.* 52: 235-244.
- Romanova N, Corredor JC, Nagy É. (2009). Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 159: 58-63.
- Songserm T, van Roozelaar D, Kant A, Pol J, Pijpers A, Ter Huurne A. (2003). Enteropathogenicity of Dutch and German avian *Reoviruses* in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet. Res.* 34: 285-295.
- Van Loon AAWM, Koopman HC, Kosman W, Mumczur J, Szeleszczuk O, Karpinska E, Kosowska G, Lütticken D. (2001). Isolation of a new serotype of avian *Reovirus* associated with malabsorption syndrome in chickens. *Vet. Quart.* 23: 129-133.

PREVALENZA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI* E *CAMPYLOBACTER LARI* IN BROILER REGOLARMENTE MACELLATI; PROFILO DI ANTITIBIOTICO RESISTENZA

Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Milandri C.², Usberti R.², Rosetti M.², Ricci G.², Casadio M.¹, Massi P.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
Sezione diagnostica di Forlì

² Azienda Unità Sanitaria Locale della Romagna, distretto di Forlì,
area Sanità Pubblica

Summary

Thermophilic *Campylobacter spp.* have been recognized as major cause of foodborne infections in many countries throughout the world. Poultry meat is the most common source for foodborne cases of human campylobacteriosis. In order to study the prevalence of *Campylobacter* in broiler chickens a study was carried out in a slaughterhouse during 2012. The study was performed on 50 flocks. The overall prevalence of the *Campylobacter spp.* infection was 76% of the tested flocks. The prevalence of the *C. jejuni* infection was 36%, *C. coli* 32%, association *C. jejuni* and *C. coli* 6% and *C. lari* infection 2% of the tested flocks. In the second part of the study twenty *Campylobacter* strains (ten strains of *C. jejuni* and ten strains of *C. coli* from skin and ceca), were tested by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) for their susceptibility to Penicilin, Betalactams, Macrolides, Tetracyclines, and Fluoroquinolones. All isolated strains of *Campylobacter* were fully susceptible to Penicilin. Low resistance were detect for Amoxicillin ranging from 10% and 20%. Very high resistance rates were detect for Macrolides (ranging from 10% and 60%), Tetracyclines (60%), and Fluoroquinolones (ranging from 40% and 50%). No isolates showed resistance to Tiamulina. *Campylobacter* is a leading foodborne bacterial pathogen, which causes gastroenteritis in humans. This pathogenic organism is increasingly resistant to antibiotics, especially Fluoroquinolones and Macrolides, which are the most frequently used antimicrobials for the treatment of campylobacteriosis when clinical therapy is warranted. For this reason, the study's antibiotic resistance is a major public health problem and current.

INTRODUZIONE

Dal 2005 l'infezione zoonotica segnalata con maggior frequenza nell'uomo è la Campilobatteriosi di cui si è registrato un continuo aumento del numero di casi negli ultimi anni. Con oltre 190.000 episodi di malattia diagnosticati ogni anno nell'uomo, rappresenta la zoonosi alimentare più frequentemente segnalata nell'Unione Europea (UE). La principale fonte d'infezione è il consumo di carne di pollame poco cotta o di prodotti alimentari pronti per l'uso venuti a contatto con carne di pollame cruda. La manipolazione sicura della carne cruda e di altri ingredienti alimentari crudi, una buona cottura ed un'attenta igiene, possono prevenire o ridurre il rischio posto dai cibi contaminati. Al fine di proteggere i consumatori da questa minaccia alla salute pubblica, l'Unione Europea ha adottato un approccio integrato alla sicurezza alimentare che coinvolge l'intera