

APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE DI UN PROTOCOLLO DI PCR IN GRADO DI DISCRIMINARE IL CEPPPO VACCINALE SG9R

Bano L.¹, Pascoletti S.¹, Drigo I.¹, Brunetta R.¹, Berto G.¹, Catania S.², Viel L.¹, Agnoletti F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Batteriologia Speciale, Vicolo Mazzini 4, 31020, Villorba, Treviso

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro, Padova

Summary

Twenty-six non-motile *Salmonella* strains have been processed by a PCR protocol able to discriminate biovars Pullorum, Gallinarum and the vaccine strain SG9R. Results revealed that SG9R strain may persist up to 12 weeks in flock affected by Marek disease. In addition, the vaccine strain has been isolated in day-old unvaccinated chicks leading to suppose a vertical transmission with eggs. Vaccine strains have been detected in flocks with high mortality and with gross lesions due to other septicemic diseases and, on the contrary, one wild strain has been isolated from the necrotic liver of one affected bird in a vaccinated flock where no anomalous mortality has been recorded. The studied PCR protocol showed to be a rapid and useful tool to identify non-motile *Salmonella* spp. of poultry origin and differentiate a well-known vaccine strain used to contain a notifiable disease from *Salmonella* Pullorum and Gallinarum field strains.

INTRODUZIONE

Le biovarianti Pullorum (SP) e Gallinarum (SG) di *Salmonella enterica* subspecie *enterica* sierotipo Gallinarum, sono responsabili di 2 importanti patologie del pollame denominate rispettivamente pullurosi e tifosi aviare. Entrambe sono malattie setticemiche che possono causare pesanti perdite negli allevamenti avicoli, ma mentre la pullurosi è tipica dei soggetti giovani, la tifosi aviare colpisce animali adulti. La distinzione tra SG e SP non è semplice poiché si basa su poche prove biochimiche differenziali quali la fermentazione del dulcitol e del glucosio e la decarbossilazione dell'ornitina, e queste risultano a volte di difficile interpretazione (OIE, 2012). Mentre la pullurosi è soggetta a piani di eradicazione nei riproduttori, la tifosi aviare viene controllata comunemente attraverso l'impiego di vaccini vivi attenuati allestiti con ceppi di SG che fenotipicamente producono colonie in fase "rugosa", tra i quali il più noto è il ceppo SG9R (Harbourne *et al.*, 1963). La fase "rugosa" è evidenziabile in laboratorio attraverso la prova di solubilizzazione in soluzione di acriflavina delle colonie, ma questa prova non è ufficialmente riconosciuta per la differenziazione del ceppo vaccinali SG9R da quelli di campo. La vaccinazione è uno strumento utile per prevenire le manifestazioni cliniche in allevamento, ma non conferisce una protezione completa rispetto all'infezione (OIE, 2012). Da un punto di vista genetico le differenze tra il ceppo vaccinale e quello di campo sono limitate alla sostituzione di singole paia di basi, rendendo perciò plausibile la possibilità di una

rivirulentazione in campo del ceppo vaccinale, peraltro mai dimostrata (Okamoto *et al.*, 2010; Van Immerseel *et al.*, 2013).

Dato che il ceppo vaccinale SG9R può persistere negli organi parenchimatosi di soggetti vaccinati fino alla 5^a settimana post-inoculazione (Silva *et al.*, 1981), ai fini diagnostici è importante avere la possibilità di discriminare tale ceppo da quelli di campo isolati in gruppi vaccinati in cui si osservi un aumento di mortalità e si giunga all'isolamento di una salmonella immobile.

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'indagine ha riguardato 26 ceppi immobili di *Salmonella* spp, isolati tra il 2005 e il 2014 in 13 allevamenti, nel corso della consueta attività diagnostica. L'isolamento era avvenuto prevalentemente da organi parenchimatosi (fegato e milza) e/o sacchi aerei, e i ceppi erano stati identificati a livello di biovariante mediante prove biochimiche standard e sottoposti a sierotipizzazione utilizzando sieri rivolti verso antigeni somatici. Nello studio sono stati inclusi come controllo 2 ceppi vaccinali appartenenti a 2 diversi lotti di produzione.

Protocollo di PCR

Per la differenziazione molecolare dei ceppi è stato applicato un protocollo di PCR in grado di identificare SP, SG e il ceppo vaccinale SG9R (Min-Su *et al.*, 2012).

Rispetto a quanto pubblicato sono state apportate alcune modifiche. In particolare, il DNA è stato estratto da colture pure di 24 ore cresciute su agar sangue utilizzando il kit Mag Max Total Nucleic Acid Extraction (Ambion). Altre modifiche del protocollo originale hanno riguardato la temperatura di annealing, la concentrazione di Mg e la coppia di primers SG.

RISULTATI

I risultati vengono riassunti in tabella 1.

Tra i 26 ceppi di salmonelle immobili testati, 13 sono risultati ceppi di SG di campo, 10 ceppi vaccinali SG9R e 3 SP.

In alcuni episodi di malattia sono stati isolati più ceppi da soggetti diversi, da organi diversi o in momenti diversi, ma quelli di uno stesso gruppo hanno dato sempre lo stesso risultato mediante PCR. In particolare si evidenzia il ripetuto isolamento del ceppo vaccinale SG9R a 18, 22 e 30 settimane in un gruppo di ovaiole vaccinate due volte in fase di pollastra (9 e 16 settimane), e colpite da malattia di Marek (gruppo "C"). Inoltre è risultato vaccinale anche un ceppo isolato da pulcini di 1 giorno destinati alla produzione di uova (gruppo "A").

DISCUSSIONE

La tifoosi aviare è una malattia che è stata inserita nel regolamento di polizia veterinaria negli anni in cui era ampiamente diffusa in Italia e si presentava spesso nella sua forma iperacuta. L'introduzione della vaccinazione con ceppi vivi attenuati ha consentito di ridurre notevolmente l'incidenza della malattia e ha contribuito ad

attenuare la gravità delle manifestazioni cliniche.

L'impiego di ceppi vaccinali ha posto però delle difficoltà dal punto di vista diagnostico non essendo disponibile un metodo ufficiale per la differenziazione tra "ceppo vaccinale" e "ceppo di campo". I risultati ottenuti in questo studio hanno dimostrato che la circolazione del ceppo vaccinale nel gruppo può perpetuarsi fino a 12 settimane, probabilmente favorita dalla simultanea presenza di una malattia immunodepressiva come la malattia di Marek (gruppi "C" ed "E"). Sebbene l'isolamento di una salmonella immobile in pulcini di pochi giorni debba fare sospettare in primis SP, non è escluso che si possa trattare invece del ceppo vaccinale SG9R, probabilmente trasmesso dai riproduttori tramite le uova e rimasto vitale anche dopo la schiusa (gruppo "A").

Il nostro studio ha messo in evidenza alcune situazioni in cui la diagnosi di tifo aviario basata su sintomatologia, lesioni compatibili e isolamento del microrganismo, senza possibilità di discriminazione dal ceppo vaccinale, potrebbe risultare non corretta. Infatti, ceppi vaccinali possono essere isolati in gruppi dove si osserva elevata mortalità e lesioni setticemiche imputabili a microrganismi diversi da SG (ad es. *Escherichia coli*), come osservato nel gruppo "G" (Tabella 1). Al contrario, ceppi di campo possono essere isolati da singoli individui con lesioni anatomopatologiche caratteristiche della tifo aviario, appartenenti a gruppi vaccinati con mortalità nella norma come osservato nel gruppo "Q" (Tabella 1).

In entrambi i casi la discriminazione fra ceppo di campo e ceppo vaccinale è indispensabile da un lato per non incorrere in errori diagnostici con possibili ripercussioni di polizia veterinaria e, dall'altro, per prendere coscienza della circolazione di ceppi di campo e poter adottare tutte quelle azioni di profilassi diretta e indiretta necessarie ad evitare la forma clinica della malattia nei successivi cicli di allevamento. A tale proposito si ricorda che l'eradicazione di ceppi di campo in allevamenti infetti è strettamente legata, oltre che ad accurate operazioni di pulizia e disinfezione a fine ciclo, anche all'eliminazione di eventuali vettori biologici, primo fra tutti *Dermanyssus gallinae* (Wales *et al.*, 2010).

BIBLIOGRAFIA

Harbourne J. F., Williams B. M., Parker W. H., Fincham I. H. (1963). The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine. *Vet. Rec.*, 75, 858–861.

Min-Su K., Yong-Kuk K., Hye-Ryoung K., Jae-Young O., Mi-Jin K., Byung-Ki A., Eun-Gyeong S., Jun-Hun K., Choi-Kyu P. (2012). Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Veterinary Microbiology*, 160:491–495.

OIE Terrestrial Manual (2012). Chapter 2.3.11. — Fowl typhoid and Pullorum disease. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.11_FOWL_TYPHOID.pdf

Okamoto A. S., Menconi A., Gonçalves G. A. M., Rocha T. S., Andreatti Filho R. F., Savano E. N.,

Sesti L. (2010). Reversion to virulence evaluation of a 9R vaccine strain of salmonella enterica serovar gallinarum in commercial brown layers. Brazilian Journal of Poultry Science, 12 (1):47-52.

Silva, E. N., Snoeyenbos, G. H., Weinack O. M., Smyser C. F. (1981). Studies on the use of 9R strain of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens. Avian Diseases. 25:38-52.

Van Immerseel F., Studhome D. J., Eeckhaut V., Heyndrickx M., Dewulf J., Dewaele I., Von Hoorebeke S., Haesebrouck F., Ven Meirhaehe H., Ducatelle R., Paszkiewicz K., Titball R. W. (2013). *Salmonella* Gallinarum field isolates from laying hens are related to the vaccine strain SG9R. Vaccine, 31:4940-4945.

Wales A.D., Carrique-Mas J.J., Rankin M., Bell B., Thind B.B. & Davies R.H. (2010) Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to Salmonella in mites, flies and litter beetles. Zoonoses Public Health, 57, (5), 299–314.

Allev.	Gruppo	Età (settimane)	Vaccinazione (SG9R)	Mortalità anomala	Lesioni compatibili con SG o SP	Altre patologie	Organo	Ceppi testati per gruppo	Risultato PCR
1	A	1	No	No	No	No	Pool org.	1	SG9R
2	B	12	No	Si	Si	No	Fegato	1	SP
3	C	18 -22- 30	Si	Si	Si	Marek	Milza, pericardio	3	SG9R
	D	24	Si	Si	No	Colisetticemia	Sacco aereo	1	SG9R
	E	26	Si	Si	Si	Marek	Sacco aereo	1	SG9R
4	F	80 85	Si	No	Si	Colisetticemia	Milza, sacco aereo, ovidutto	6	SG
5	G	28	Si	Si	Si	Colisetticemia	Sacco aereo	1	SG9R
6	H	26	Si	No	Si	No	Fegato	4	SG
7	I	22	No	Si	Si	No	Fegato	1	SG
8	L	1	No	Si	Si	No	Fegato	2	SP
9	M	ND	Si	ND	ND	ND	ND	1	SG9R
10	N	ND	Si	Si	Si	No	Milza, ovaio, cervello, polmone	1	SG
11	O	13	Si	No	No	ND	Pool org.	1	SG9R
12	P	ND	Si	No	No	No	Milza	1	SG9R
13	Q	20	Si	No	Si	No	Fegato	1	SG
lotto A	-	-	-	-	-	-	-	-	SG9R
lotto B	-	-	-	-	-	-	-	-	SG9R

Tabella 1. Risultati ottenuti dall'applicazione del protocollo oggetto dello studio in relazione all'età degli animali, alla mortalità anomala rilevata, all'osservazione di lesioni anatomopatologiche compatibili con pullurosi o tifosi aviare e alla presenza o meno di altre patologie. SP: Biovariante Pullorum; SG: Biovariante Gallinarum; SG9R: ceppo vaccinale 9R; ND: informazione non disponibile.