

CIRCOLAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS NETB* POSITIVI IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL CENTRO ITALIA

Profeta F.^{1*}, Di Giannatale E.², Scacchia M.², Orsini M.², Toscani T.³, Marsilio F.¹, Di Francesco C.E.¹

¹University of Teramo, Faculty of Veterinary Medicine, Loc. Piano D'Accio, 64100 Teramo, Italy

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", 64100, Teramo, Italy

³Gesco Cons. Coop a r.l., Via Bacchelli 1, Loc. Casemolino, 64020, Castellalto, Teramo, Italy

* Presenting author: fprofeta@unite.it

Keywords: Poultry, Necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, PFGE, *netb* gene.

Summary

Clostridium perfringens (CP) is one of the main pathogen involved in enteric diseases in poultry. NetB, a pore-forming toxin plasmid encoded, is considered the main responsible for the mechanism involved in enterocyte damage during infection (1; 4; 5).

Aim of this study is to evaluate the presence of *netb* positive CP strains in broiler and turkey flocks.

Environmental specimens and selective intestinal samples were evaluated for CP by means microbiological, biomolecular and histological investigation.

Genetic diversity among detected strains was investigated by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Finally, the complete *netb* toxin-coding gene from n. 2 clostridial strains has been sequenced.

This study represents the first attempt to evaluate the presence of *netb* positive CP strains in poultry flocks located in Central Italy and to provide further insight into the genetic relatedness between strains circulating in this part of Italy and strains recovered elsewhere.

INTRODUZIONE

L'Enterite necrotica (EN) è una patologia di frequente riscontro nel settore avicolo industriale, la cui evoluzione, subclinica o clinicamente manifesta, ha conseguenze negative, oltre che in termini di salute degli animali allevati, anche di tipo economico. *Clostridium perfringens* (CP), agente eziologico della suddetta patologia, è un batterio Gram positivo, anaerobio e sporigeno, di forma bastoncellare, piuttosto sottile e di piccole dimensioni (0,2 X 2-5 µm), a distribuzione ubiquitaria, produttore di tossine, alcune delle quali attive a livello enterico; il tossinotipo responsabile dell'EN delle specie avicole è il tipo A. Sebbene per molto tempo la tossina α sia stata ritenuta l'effettiva responsabile della malattia, studi recenti hanno evidenziato che l'elemento chiave nell'induzione della EN è una tossina "minore", la proteina *Necrotic enteritis toxin B-like*

(NetB), identificata per la prima volta nel 2008 in Australia (5). Uno studio eseguito nel 2009 a partire da campioni raccolti in allevamenti del Nord Italia ha rivelato la presenza del gene *netb* nel 27% dei 107 ceppi di CP provenienti da broiler e da ovaiole, di cui il 93% associati a segni clinici ascrivibili a EN (2); a conferma della presenza di questi ceppi contestualmente all'enterite necrotica; in seguito, in occasione di un focolaio di malattia verificatosi nel 2013 in due allevamenti di galline ovaiole, sono stati isolati 2 ceppi di CP *netb*-positivi (3). Recentemente, uno studio eseguito su 106 ceppi -positivi isolati da tacchini da carne e da riproduzione con sintomatologia sospetta, non ha portato, invece, ad alcuna identificazione di ceppi *netb* (4).

La presente indagine ha avuto lo scopo di valutare la presenza di ceppi di CP *netb* positivi anche in allevamenti avicoli del Centro Italia, data l'assenza di informazioni epidemiologiche relative alla circolazione dei suddetti ceppi, nonché all'incidenza della patologia in questo territorio.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento ha avuto inizio a Novembre 2015, è terminato a Maggio 2017 e ha interessato un n. 15 allevamenti; la maggior parte delle strutture visitate era situata in Provincia di Teramo, ad eccezione dei campionamenti verificatisi su indicazione dei rispettivi Medici Veterinari presso le Province di Fermo, Foggia, Forlì e Bologna.

Quando pianificato, il campionamento ambientale, a cadenza settimanale, è stato eseguito mediante l'impiego di soprascarpe (Agritamp plus02, Biogenetics, Padova, Italia). Altre volte, su segnalazione di sintomatologia sospetta, il campionamento ha previsto sia l'impiego di soprascarpe che il recupero di carcasse di animali deceduti. Complessivamente, sono stati recuperati n. 117 paia di soprascarpe e n. 51 carcasse.

Isolamento e identificazione; indagini anatomo-istopatologiche

I campioni raccolti mediante soprascarpe sono stati diluiti al 10% p/v in soluzione fisiologica sterile, quindi miscelati mediante *Stomacher* (VWR International pbi, Milano, Italia). Un ml della miscela così ottenuta è stata dapprima trattata termicamente a 75° C per 20 minuti, allo scopo di eliminare le forme batteriche vegetative presenti nel campione e, quindi, trasferito in brodo Brain Heart Infusion (BHI) in rapporto 1:5 v/v.

Le carcasse sono state sottoposte ad esame necroscopico; particolare attenzione è stata data all'osservazione del digerente, allo scopo di identificare eventuali lesioni macroscopiche del piccolo intestino; in tali casi, sezioni d'intestino sono state sottoposte ad esame istologico, previa colorazione con Ematossilina ed Eosina e di Gram, al fine di caratterizzare le lesioni identificate.

Inoltre, sono state prelevate tre porzioni d'intestino da ciascun animale, conformemente a quanto riportato in precedenti lavori, da destinare alle successive indagini microbiologiche (3).

A tal fine i campioni di intestino sono stati trasferiti in 10 ml di tioglicollato

rigenerato e, anche questi sottoposti a trattamento termico a 75° C per 20'. Entrambe le miscele così ottenute (BHI e tioglicollato) sono state poste ad arricchimento in anaerobiosi (GenBag Anaer, BioMerieux, Francia) per 24 ore alla temperatura di 37 ± 2° C, per essere successivamente trasferite su piastre di Agar sangue, mentre un'aliquota è stata destinata all'estrazione del DNA, utile nelle successive prove biomolecolari.

Le colonie batteriche morfologicamente riferibili al genere *Clostridium*, rotondeggianti, traslucide e caratterizzate da un doppio alone di emolisi, sono state sottoposte a colorazione di Gram, tipizzazione biochimica con sistema VitekÒ (Biomerieux, Francia) e tipizzazione molecolare.

Estrazione del DNA e real-time PCR per i geni *cpa* e *netb*

L'estrazione del DNA batterico è stata eseguita mediante *Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit* (Promega, Italia), a partire da aliquote di 300 µl di BHI e tioglicollato (utilizzati per miscelare i campioni di sovrascarpe e di intestino, rispettivamente), oltre che dalle colonie, per confermare l'avvenuto isolamento in purezza.

Al fine di identificare i ceppi di CP tossinotipo A e *netb* positivi, è stato scelto un protocollo di *real-time* PCR a partire dagli estratti di DNA ottenuti sia da brodocoltura che dalle colonie ottenute in purezza.

Tale protocollo consente di identificare e amplificare, attraverso lo stesso ciclo, specifiche porzioni del gene *cpa*, codificante per la tossina α (402 bp) di CP, e del gene plasmidico *netb* (75 bp), codificante per la tossina netB, facendo ricorso a due coppie distinte di primers, e sfruttando le due diverse temperature di *melting* (77 ± 1,5° C e 72 ± 1,5° C, rispettivamente) di ciascun amplificato target eseguendo il protocollo cortesemente fornito dal gruppo di lavoro del Dipartimento di Patologia generale, Batteriologia e Patologia aviaria della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Gent, Belgio (1).

Caratterizzazione dei ceppi di *Clostridium perfringens* mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

I ceppi di CP isolati e identificati in seguito alle prove microbiologiche e biomolecolari sono stati sottoposti a caratterizzazione genetica mediante PFGE, seguendo le indicazioni riportate da Lhys e colleghi, con alcune modifiche (6).

Sequenziamento del gene *netb* ed analisi filogenetica

L'estratto di DNA di un ceppo di CP *netb* positivo recuperati nel corso della presente indagine, da carcasse di tacchino è stato sottoposto ad amplificazione e sequenziamento dell'intero gene plasmidico codificante la tossina NetB.

Inoltre, l'amplificato di 960 bp è stato tradotto nella sequenza amminoacidica corrispondente facendo ricorso all'applicazione web *Sequence manipulation suite-SMS* (<http://www.bioinformatics.org>) ed è stato, quindi, identificato mediante la comparazione con analoghe sequenze amminoacidiche depositate in *GenBank* attraverso il programma *Blastp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

RISULTATI

In seguito all'esame necroscopico, è stato possibile osservare lesioni riferibili ad enterite in n. 4 carcasse esaminate, di cui n. 3 tacchini provenienti da allevamenti delle Province di Fermo e di Forlì- Cesena, ed n. 1 broiler di un allevamento di Teramo. Le lesioni erano localizzate a livello del piccolo intestino, la cui parete appariva ispessita a causa dell'edema infiammatorio, e sulla sua superficie l'epitelio, in evidente necrosi, era ricoperto da pseudomembrane biancastre o marrone chiaro, piuttosto estese. L'istologia ha confermato la presenza di necrosi dei villi, la cui architettura risultava decisamente alterata, con detriti cellulari e ammassi di batteri di forma bacillare positivi alla colorazione di Gram.

Le prove d'isolamento hanno consentito di recuperare n. 85 isolati riferibili a CP, quindi stoccati in Microbank™ a -80° C per ulteriori impieghi.

Centosessantacinque estratti di DNA sono stati sottoposti ad amplificazione mediante *real-time* PCR, n. 150 dei quali *cpa* positivi (90%); tra questi, n. 34 (22%) sono risultati anche *netb* positivi. Gli estratti *netb* positivi provengono da due allevamenti, uno di tacchini della Provincia di Teramo, sottoposto a campionamento settimanale, e nel quale era stata data indicazione di disturbi enterici, di moderata entità, intorno alle tre settimane di vita degli animali, e un allevamento localizzato in Provincia di Foggia che ospitava broiler allevati all'aperto, oggetto di un singolo campionamento avvenuto in seguito a sospetto clinico.

La PFGE è stata applicata su n. 45 ceppi di CP derivanti dagli allevamenti oggetto di studio; inoltre sono stati inclusi nella prova n. 6 ceppi di CP provenienti dal Dipartimento di Patologia Generale, Batteriologia e Patologia aviaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Gent, Belgio, ed n. 2 ceppi, cortesemente forniti dal Dott. Luca Bano, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, laboratorio di Treviso (IZSVE).

Sono stati identificati n. 34 pulsotipi distinti di CP. I campioni aventi un'identità $\geq 90\%$ sono stati considerati appartenenti alla stessa popolazione e tra questi n. 6 coppie hanno riportato un'identità pari al 100%. La sequenza del gene plasmidico è stata depositata nella banca dati GenBank, con Acc. No. KY923245 e nome "NetB_FP69_ITA_2017_Turkey" e la comparazione con sequenze analoghe depositate su *GenBank* ha confermato l'identità del gene *netb*. L'analisi filogenetica ha permesso di evidenziare la relazione genetica esistente con analoghe sequenze disponibili in banca dati, prevalentemente di origine danese e belga, inclusi due isolati provenienti dal Canada e dall'Australia.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro riporta i risultati di un monitoraggio ambientale, eseguito nel corso di un anno e mezzo, avente l'obiettivo di valutare la circolazione di ceppi di CP *netb* positivi negli allevamenti avicoli del Centro Italia. Inoltre, sono stati identificati per la prima volta in Italia ceppi CP *netb* positivi anche in allevamenti di tacchini; in tali casi, l'isolamento è avvenuto nel corso del campionamento settimanale in concomitanza di segni clinici moderati ma senza lesioni evidenti all'esame necroscopico.

Lesioni imponenti di enterite necrotica, con aumento dell'indice di mortalità nell'allevamento, sono state osservate in presenza di ceppi di CP *cpa* positivi ma

non produttori di tossina NetB. Questi dati lasciano ipotizzare che l'insorgenza dell'enterite necrotica nel pollo e nel tacchino non dipenda soltanto dalla presenza di clostridi *netb* positivi, così come la sola presenza di questi ultimi non sembra essere sufficiente a determinare lesioni evidenti. Difatti, il ruolo della porina NetB è stato evidenziato solo negli ultimi anni ma ciò non toglie che anche altre tossine clostridiali possano intervenire nella patogenesi dell'EN.

I risultati della prova di PFGE ottenuti in questo lavoro sono stati messi in relazione con alcune variabili quali la sede dell'allevamento, la specie ospite e la matrice campionata, con lo scopo di formulare ipotesi circa la diversità genetica, l'origine e la diffusione dei ceppi raccolti.

Dall'analisi del dendrogramma è emersa una notevole eterogeneità tra i ceppi, con assenza di uno o pochi ceppi dominanti e provvisti di maggiore patogenicità, in analogia con quanto riportato in precedenti studi eseguiti a partire da ceppi recuperati in occasione di quadri clinici di moderata entità. Al contrario, l'analisi filogenetica del gene *netb* ha permesso di evidenziare una sostanziale identità con le analoghe sequenze finora disponibili in banche dati.

Nonostante tali perplessità, è possibile affermare che la *real-time* PCR adottata possa rappresentare un metodo diagnostico rapido, ma allo stesso tempo sensibile e specifico, in grado di confermare i sospetti di malattia. Ciò consentirebbe di intervenire tempestivamente attraverso terapie mirate ma, soprattutto, con piani di controllo, così da limitare le forme cliniche di infezione nel medio e lungo periodo.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro fornisce nuove informazioni relative alla diffusione di CP negli allevamenti avicoli industriali del Centro Italia, identificando, mediante metodiche microbiologiche classiche e biomolecolari, ceppi di CP di tipo A e fra questi, i portatori del gene *netb* (notoriamente più virulenti).

Pertanto, sulla base dei dati finora disponibili e dei risultati del presente lavoro, sarebbe interessante approfondire le conoscenze relative a CP, in particolare l'interazione ospite- microorganismo, per poter meglio fronteggiare questa temibile patologia per il settore avicolo, senza trascurare l'attuale approccio *One health* della Comunità Scientifica, secondo cui la sanità umana, quella animale e la tutela dell'ambiente sono da considerare come obiettivi prioritari e, soprattutto, correlati fra loro; dunque dalla tutela dei primi scaturiranno conseguenze positive anche per gli altri.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Antonissen G., Croubels S., Pasmans F., Ducatelle R., Eeckhaut V., Devreese M., Verlinden M., Haesebrouck F., Eeckhout M., De Saeger S., Antlinger B., Novak B., Martel A., Van Immerseel F. 2015. Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in boiler chickens, predisposing to necrotic enteritis. *Vet. Res.* **46(1)**: 98.
- 2) Berto G., Agnoletti F., Drigo I., Tonon E., Vascellari M., Fracas V., Bano L., 2015. Clostridial co- infection episodes in commercial laying hens. *Avian Pathol.* **44 (3)**: 200- 203.

- 3) Drigo I., Agnoletti F., Bacchin C., Guolo A., Cocchi M., Bonci M., Bano L., 2009. Diffusion of *Clostridium perfringens* NetB positive strains in healthy and diseased chickens. *Ital. J. Anim. Sci.* **8 (4)**: 761- 764.
- 4) Giovanardi D., Drigo I., De Vidi B., Agnoletti F., Viel L., Capello K., Berto G., Bano L. 2016. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased turkeys in Italy. *Avian pathol* **45(3)**, 376- 380.
- 5) Keyburn A.L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T.L., Ford M.E., Parker D., 2008. *NetB*, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *Plos Pathog.* **4**, 26.
- 6) Lyhs U., Perko-Mäkelä P., Kallio H., Brockmann A., Heinikainen S., Tuuri H., Pedersen K. 2013. Characterisation of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poul. Sci.* **92**, 1750-1757.

ATTIVITÀ VETERINARIE DEL CENTRO RECUPERO ANIMALI SELVATICI DI NAPOLI NEL 2016

Rampa L.¹, Borrelli L.², Gargiulo A.¹, De Luca Bossa L.M.¹, Paone S.², Raia P.¹, Fioretti A.², Dipineto L.²

¹ Centro di Recupero Animali Selvatici Federico II di Napoli; ² Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II

Summary

The aim of this study was to describe the main reasons of hospitalization and the related follow-up of wild birds brought to the Wildlife Rescue and Rehabilitation Center (CRAS) Federico II of Naples. A total of 1583 wild birds belonging to different orders were admitted to this CRAS. Trauma was the most frequent cause of recovery and occurred in 39% of the animals; 23% were admitted because immature; 22% were sequestered animals; 8% were represented of medical cases and 8% were admitted for "other causes". The follow-up showed that 60% of the birds were released, 11% and 24 % had to be euthanized or died, respectively, whereas 3% is still hospitalized and 2% was entrusted. In this CRAS, epidemiological investigations on infectious and parasitological agents were also conducted. In this context, 148 intestinal contents were collected from birds of prey carcasses to isolate *Campylobacter* spp., *E. coli*, and *Salmonella* spp. which showed a prevalence of 33.1%, 6.8% , and 6.8%, respectively. Furthermore, 145 samples of faeces were collected from animals admitted to the center to detect endoparasites showing a positivity of 68% for endoparasites mainly represented by *Capillaria* spp., *Centrorhynchus* spp., Ascarididae and Eimeriidae families. We may conclude that a CRAS plays an essential role on an environment, because the wildlife may act as sentinels of ecosystem health in order to supply significant information about the health status of the natural environment where animals live, which is itself connected to public health issues.

INTRODUZIONE

Con Decreto Dirigenziale n. 94 del 06.05.2010 venne istituito, in Regione Campania, il primo Centro Recupero Animali Selvatici (CRAS) dell'attuale Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli Federico II. Il CRAS Federico II è ubicato presso il Presidio Ospedaliero Veterinario dell'ASL Napoli 1 Centro e opera, nell'ambito delle sue attività, in sinergia con il Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria (CRIUV) che ha come finalità quella di fungere da strumento operativo di approfondimento ed analisi del rischio in materia di igiene urbana veterinaria. Lo scopo del CRAS Federico II è, invece, quello di reintrodurre in natura la fauna selvatica, qualora ne sussistano le condizioni, a seguito del ricovero, della cura e della riabilitazione. Fondamentale è, inoltre, il ruolo di monitoraggio del territorio che assume un CRAS, in quanto la fauna rappresenta un ottimo bio-indicatore in grado di fornire rilevanti informazioni sulle condizioni sanitarie dell'ambiente in cui vivono gli animali (Schwartz, 2007). Lo scopo del presente studio è quello di illustrare le principali attività veterinarie svolte dal Centro Recupero Animali Selvatici Federico II di Napoli prendendo in