

CARATTERIZZAZIONI GENOTIPICHE E FENOTIPICHE DI CEPPI DI *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* ISOLATI DAL POLLAME IN ITALIA

Bano L.¹, Cornaggia M.¹, Di Castri A.¹, Zandonà L.¹, Rizzardi A.¹, Zarpellon G.¹, Guolo A.¹, Ferro T.¹, Moschioni C.¹, Tonon E.¹, Bacchin C.¹, Ceruti R.², Giovanardi D.³, Catania S.⁴, Drigo I.¹

¹ Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Batteriologia Speciale, Villorba, Treviso

² Laboratorio Gesco S.C.A., Cazzago San Martino, Brescia

³ Laboratorio Tre Valli, San Martino Buon Albergo, Verona

⁴ Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Verona

Summary

In this study, we characterized 98 strains of *Riemerella anatipestifer* (RA), isolated in Italy from commercial (n. 82) and backyard (n. 16) poultry flocks, in a 7 years period (2012-2018).

Phenotypical analysis demonstrated that 89.7% of the isolates were serotype “1”, 3% serotype “18”, 1% serotype “13”, 6.3% resulted untypable strains.

All the Italian RA strains belonged to 13 new sequence types (STs), genetically distant from the Asian ones. In 2013 a new sequence type, ST 46, appeared simultaneously in different commercial flocks of turkeys and in few years it became the most prevalent ST circulating in Italy. PFGE characterization showed that most of ST 46 strains were clones or genetically strictly related. In duck flocks ST 52 and ST 54 and, sporadically, ST 46 were detected.

How ST 46 appeared simultaneously and become the prevalent ST in Italian turkey commercial flocks in few years, still remain to be elucidated.

INTRODUZIONE

Riemerella anatipestifer (RA) (precedentemente nota come *Pasteurella anatipestifer*), è un cocco-bacillo Gram negativo, immobile, catalasi e ossidasi positivo, appartenente alla famiglia delle *Flavobacteriaceae* e al genere *Riemerella*, che comprende solo altre due specie: *Riemerella columbina* e *Riemerella columbipharingys*, isolate solo da specie aviarie (Vancanneyt *et al.* 1999; Rubbenstroth *et al.*, 2013).

La prima segnalazione di tale microorganismo risale all'inizio del secolo scorso, associata primariamente ad una polisierosite degli anatidi (Riemer, 1904). Oggi la malattia è da considerarsi cosmopolita anche se il maggiore numero di segnalazioni proviene dal continente asiatico su anatidi.

In Italia la malattia è stata descritta per la prima volta nel 1979 in tacchini da carne di 70 giorni, e in polli da carne di 40-50 giorni (Pascucci *et al.*, 1981). La sintomatologia nel tacchino era caratterizzata da paralisi delle ali e delle gambe, opistotono, torcicollo, ribaltamento, cecità e mortalità del 20%. Nel pollo la sintomatologia era inizialmente respiratoria, subito seguita da forma neurologica con tremori, movimenti scoordinati del capo e tassi di mortalità compresi tra il 3% e il 5%. Successivamente sono stati osservati anche quadri di zoppia dovuti a localizzazione articolare del patogeno e conseguente artrite (Giovannetti e Pascucci, 1983). Nell'ultimo decennio si è assistito a delle ondate epidemiche che hanno avuto il loro apice nel 2015, anno in cui si è ricorso anche a

immunizzazione massiva di gruppi di tacchini con vaccini stabulogeni. La sierotipizzazione di RA ha subito diverse rivisitazioni negli anni passando dall'assegnazione di lettere a quella di numeri. Attualmente sono noti 21 sierotipi di RA, anche se non c'è accordo nel mondo scientifico sui ceppi di riferimento che rappresentano ciascun sierotipo. Il primo studio di sierotipizzazione condotto su 75 ceppi italiani isolati dal '79 all'89, aveva evidenziato la circolazione prevalente del sierotipo 1 (ex. "A"), ma erano stati rilevati anche dei ceppi non tipizzabili con il panel di sieri allora a disposizione (sierotipi USA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, B) (Pascucci *et al.* 1990). Successivamente, studi di genotipizzazione hanno mostrato che 2 ceppi di riferimento appartenenti al sierotipo "4" in realtà non erano RA ma *Wautersiella falsenii* (Christensen e Bisgaard, 2009). L'esistenza di tale sierotipo appare pertanto messa in discussione. Sono state impiegate diverse metodiche per la caratterizzazione molecolare dei ceppi: rep-PCR (ripetitive extragenic palindromic sequence polymerase chain reaction), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction) (Yu *et al.* 2008), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del gene 16s rRNA o del gene *OmpA* (Subramaniam *et al.* 1997), analisi con endonucleasi *Hinfl* (Rimler e Nordholm, 1998), MLST (Multi Locus Sequence Typing) e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) con enzima di restrizione *SmaI* (Yu *et al.* 2008). La caratterizzazione genetica dei ceppi di RA è uno strumento indispensabile per cercare di comprendere l'epidemiologia della malattia e suggerire delle azioni profilattiche negli allevamenti da reddito. Con il presente lavoro sono state studiate le caratteristiche genotipiche e alcune caratteristiche fenotipiche (sierotipo) di ceppi di RA circolanti in Italia, dal 2012 al 2018.

MATERIALI E METODI

Collezione dei ceppi

La collezione batterica è stata costruita grazie all'apporto di ceppi di RA isolati presso laboratori diagnostici privati o di Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Tra le centinaia di ceppi raccolti per gli studi di caratterizzazione, sono stati selezionati solo un ceppo per allevamento, o più ceppi dello stesso allevamento a patto che fossero stati isolati a distanza di almeno 12 mesi l'uno dall'altro. In totale sono stati analizzati 98 ceppi di RA isolati tra il 2012 e il 2018, da 63 tacchini da carne, 20 polli da carne, 10 anatre, 3 faraone e 2 oche. Ottantadue dei ceppi selezionati provenivano da allevamenti commerciali e 16 da allevamenti familiari.

L'isolamento è avvenuto su terreni non selettivi a base di sangue (agar sangue o columbia agar), incubati a 37 °C in condizioni di microaerofilia (5% CO₂) per 24 o 48 ore. Tutti gli isolati sono stati ottenuti dal cervello di soggetti deceduti in seguito a sintomatologia neurologica compatibile con riemerellosi o da lesioni anatomopatologiche riferibili a questa malattia (polisierosite e artrite).

L'identificazione è avvenuta mediante MALDI TOF MS (Bruker Daltonics), dopo opportuna implementazione del database dello strumento con ceppi di riferimento filogeneticamente vicini a RA (in particolare con *R. columbina* e *R. oropharyngis*), ed è stata successivamente confermata attraverso l'applicazione di specifici protocolli di real-time PCR (Zhang *et al.*, 2017).

Sierotipizzazione

I sieri impiegati per la sierotipizzazione dei ceppi di campo sono stati prodotti su coniglio applicando protocolli consolidati disponibili in letteratura (Bisgaard M., 1982). I ceppi

di referenza appartenenti ai 21 sierotipi oggi conosciuti, utilizzati per l'immunizzazione dei conigli sieroproduttori, sono stati forniti dal Prof. Christensen H., Veterinary Disease Biology, Università di Copenhagen, che qui si ringrazia.

Le colture sottoposte al test sono state ottenute su agar sangue dopo 18 ore d'incubazione a 37 °C in condizioni di microaerofilia. La sierotipizzazione è stata condotta stemperando una colonia della coltura in esame su una goccia di ciascun antisiero prodotto, preventivamente posizionata su un comune vetrino porta-oggetto, posto su fondo scuro. La formazione in pochi secondi di flocculazioni bianche, veniva interpretata come fortemente positiva per quel sierotipo. Reazioni più tardive o senza una netta agglutinazione, venivano annotate come debolmente positive. Un'ansata della coltura in esame veniva stemperata anche su una goccia di soluzione fisiologica per identificare eventuali ceppi autoagglutinanti.

Caratterizzazione genetica

I ceppi isolati nell'ambito della ricerca sono stati caratterizzati geneticamente attraverso Multilocus Sequence Typing (MLST) e Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

L'MLST è stato eseguito secondo il protocollo descritto da Zhou *et al.* (2015), che prevede l'amplificazione dei seguenti geni: *mdh*, *gluD*, *rpoB*, *dnaB*, *gyrA*, *groEL* e *gpi*. Le sequenze ottenute sono state analizzate ed inserite nel *Riemerella antipestifer* sequence/profile database (<http://pubmlst.org/ranatipestifer/>) a cura del Dr. Di Zhou. L'elaborazione grafica è stata ottenuta impiegando il software Bionumericis, versione 7.6 (Applied Maths). I STs sono stati analizzati attraverso il software Phyloviz versione 2.0 (<http://www.phyloviz.net/>) che, applicando l'algoritmo goeBURST, è in grado di raggrupparli in clonal complex sulla base della singola variazione di locus.

La PFGE è stata eseguita secondo il protocollo pubblicato da Yu *et al.* (2008). La similarità tra i ceppi ottenuti è stata studiata impiegando il software Bionumericis versione 7.6 (Applied Maths). Tale software permette di costruire un dendrogramma sulla base delle similarità tra i pulsotipi, che viene calcolata utilizzando il Dice similarity coefficient. Come algoritmo di clustering è stato utilizzato l'UPGMA con una tolleranza dell'1,5% e ottimizzazione dell'1%.

RISULTATI

Sierotipizzazione

L'89,7 % dei ceppi analizzati (88/98) apparteneva al sierotipo "1", il 3% (3/98) al sierotipo "18", 1 ceppo isolato da polli di un allevamento rurale apparteneva al sierotipo "13" mentre 6 ceppi hanno dato delle reazioni dubbie o assenti o hanno reagito con più di un siero. Questi ceppi saranno ritestati attraverso il metodo della sierotipizzazione lenta. Il sierotipo "1" era presente in tutti gli anni in cui si è svolto l'arruolamento dei ceppi, e in tutte le specie animali incluse nello studio, indipendentemente dal fatto che si trattasse di isolati da allevamenti commerciali o da allevamenti rurali. I tre ceppi appartenenti al sierotipo 18 erano tutti stati isolati in allevamenti commerciali (2 da tacchini da carne e uno da faraone) nei soli anni 2012 e 2013.

MLST

L'analisi genetica dei ceppi attraverso MLST ha messo in evidenza che i ceppi italiani appartenevano tutti a 13 sequence type (STs) mai descritti prima, e chiaramente distinti dai ceppi isolati in Cina (figura 1). Solo 6 ceppi sono risultati legati geneticamente a

ceppi cinesi. Tra questi ultimi, 2 isolati da tacchini da carne nel 2012 appartenevano al sierotipo “18”; 2 isolati da allevamenti commerciali di faraone appartenevano al sierotipo “18”, un isolato da pollo rurale apparteneva al sierotipo “13” e uno isolato da oca era risultato non sierotipizzabile. Il numero di ceppi appartenente a ciascun sequence type con assegnata la specie d’isolamento è riassunto in tabella 1.

L’80,5% dei ceppi isolati da allevamenti industriali e il 43,75% dei ceppi isolati da allevamenti rurali appartenevano al solo ST 46. Nei ceppi isolati da anatidi (anatre e oche) il ST 52 si è dimostrato prevalente (50%), mentre il ST 46 è stato individuato nel 25% dei ceppi isolati in queste specie. Tutti i ceppi ST 46 appartenevano al sierotipo 1, tranne 3 ai quali non si è riusciti ad assegnare alcun sierotipo attraverso la sierotipizzazione rapida.

Tra i 9 ceppi del 2012 isolati da allevamenti commerciali, nessuno apparteneva al ST 46, mentre nel 2013 tale ST è stato identificato in 4 dei 9 ceppi selezionati per quest’anno, sempre da allevamenti commerciali di tacchini da carne. Dal 2014 al 2018 il ST 46 è stato rilevato in una percentuale di ceppi che variava dal 96 al 100% dei ceppi analizzati in ciascun anno.

L’analisi dei ST con software dedicati, ha portato ad individuare 4 clonal complex formati da un minimo di 2 a un massimo di 3 ST. Quattro STs non sono stati associati a nessun clonal complex (singleton), e tra questi compare anche il ST epidemico 46.

PFGE

Ponendo arbitrariamente un convenzionale cut-off dell’80 % di similarità tra i pulsotipi ottenuti, si è potuto individuare 11 diversi cluster. I cluster “I”, “II”, e “III” comprendono in tutto 9 ceppi di cui 6 appartenenti a sierotipi diversi dal sierotipo “1”, isolati tra il 2012 e il 2013 e uno isolato nel 2017 da un’oca. Nessuno di questi ceppi apparteneva al ST 46.

Il cluster “IV” è il più ampio, comprendendo al suo interno 67 ceppi, di cui 64 appartenenti al sierotipo “1” (3 non tipizzabili) e 66 ceppi al ST 46 (1 ceppo era ST 53). Nei cluster “V”, “VI” e “VII” e “IX” si trovano 7 ceppi: 4 isolati da pollo e 3 da tacchino, appartenenti tutti al sierotipo “1” e al ST 46.

Il cluster “VIII” è il secondo più ampio in termini di numerosità, comprendendo al suo interno 8 ceppi appartenenti tutti al sierotipo “1”, mentre 7/8 sono risultati ST 52 e 1 ST 54. Sei di questi ceppi erano stati isolati da anatre (2 di allevamenti commerciali e 4 da allevamenti rurali), uno da un’oca rurale e uno da un pollo rurale.

Nel cluster “X” si collocano 6 ceppi del sierotipo “1”, isolati da allevamenti commerciali di polli e tacchini tra il 2012 e il 2013, di cui 5 appartenenti al ST 50 e 1 al ST 49.

Il cluster “XI” è rappresentato da un unico ceppo isolato da un’anatra rurale, di sierotipo non determinabile e appartenente al ST 56.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dimostrano come i ceppi isolati in Italia siano molto diversi da quelli di origine asiatica, confermando una sostanziale “identità geografica”.

I dati di sierotipizzazione mostrano una certa evoluzione temporale dei ceppi di RA circolati negli allevamenti italiani commerciali di tacchini da carne. Infatti, nel 2012 in questi allevamenti è stata rilevata la circolazione sia del sierotipo “1” che del sierotipo “18”, anche se l’analisi ha riguardato un numero esiguo di ceppi. È interessante osservare come il sierotipo “18” circolasse anche in allevamenti commerciali di faraone nel 2013.

Dal 2014 in poi, negli allevamenti commerciali di polli e tacchini è stata rilevata la circolazione solo di ceppi appartenenti al sierotipo “1”. Questa evoluzione temporale è confermata anche dai risultati dell’MLST e PFGE. Infatti, nel 2012, gli isolati di RA da allevamenti commerciali di polli e tacchini appartenevano a STs diversi rispetto al ST 46, che dal 2014 al 2018 è risultato essere epidemico in queste realtà produttive.

Per quanto riguarda la PFGE, è interessante osservare come quasi il 70 % dei ceppi analizzati sia collocato in un unico cluster (IV) e che tali ceppi appartengano tutti al sierotipo “1” e al ST 46. Tale metodica, che si basa sulla caratterizzazione dell’intero genoma, mostra che 60/67 ceppi hanno un’omologia genetica del 100%, risultando pertanto dei cloni, distribuiti primariamente in allevamenti di tacchini e polli da carne e, sporadicamente, in allevamenti di faraone e anatre. In quest’ultima specie, che è considerata l’ospite più importante nel continente asiatico, la maggior parte dei ceppi inclusi nello studio, seppure di sierotipo “1”, appartenevano a STs diversi, rappresentati dal ST 52, indipendentemente che i ceppi provenissero da allevamenti rurali o commerciali. Come il ST 46 abbia potuto comparire pressoché simultaneamente in allevamenti di tacchini dislocati in province e regioni diverse del nord Italia, resta ancora da capire.

Mentre nel tacchino la riemerelosi è una patologia da considerarsi endemica, nel pollo si presenta solo sporadicamente. Viste le stringenti misure di biosicurezza che caratterizzano gli allevamenti avicoli industriali, il passaggio dal tacchino al pollo e viceversa potrebbe forse essere giustificata da una sporadica promiscuità di personale tra le due tipologie di allevamento che si può verificare ad esempio durante le operazioni di vaccinazione (tacchino) o di carico durante il ciclo produttivo (es. sfoltimento delle femmine negli allevamenti di broiler).

Dai risultati ottenuti appare chiaro che eventuali strategie vaccinali di contenimento della riemerelosi in allevamenti commerciali italiani di tacchini devono prevedere l’adozione di presidi immunizzanti allestiti a partire sicuramente da ceppi appartenenti al sierotipo “1” ed eventualmente “18”, vista la loro circolazione nel nostro paese, anche se in anni diversi. Dato che l’immunità verso batteri Gram-negativi viene conferita non solo dalla componente lipopolisaccaridica che è strettamente legata alla definizione di “sierotipo”, ma anche da altre componenti della membrana cellulare e prodotti batterici noti (come la proteina Omp) e non, sarebbe opportuno includere in eventuali vaccini inattivati, ceppi geneticamente distanti tra loro, che hanno però causato la malattia in allevamenti commerciali. Tra questi si segnalano i ceppi appartenenti ai ST 47, 48, 49 (o 50) e 51 che, oltretutto, si sono collocati in cluster diversi tra loro. Per quanto riguarda invece l’immunizzazione di anatidi, i STs d’interesse sono soprattutto il 52 e il 54, oltre al 46.

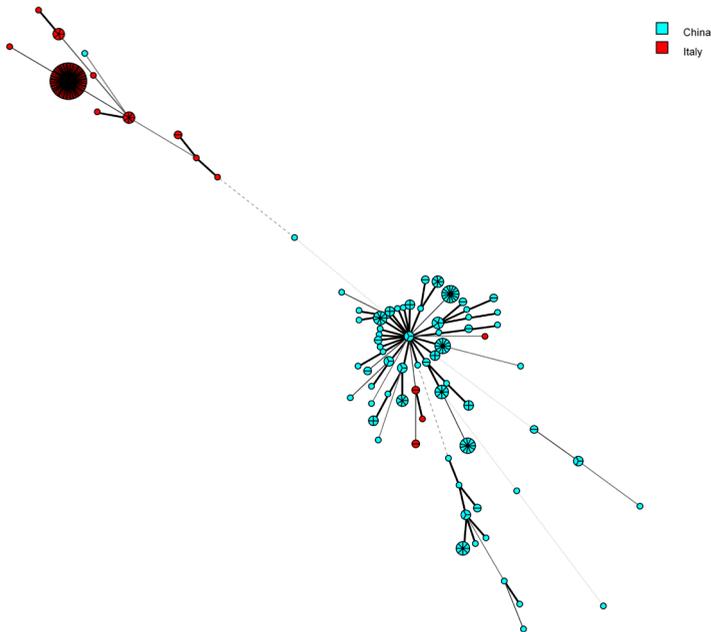
CONCLUSIONI

La riemerelosi è una malattia endemica nel nostro paese che, in alcuni anni (soprattutto 2014 e 2015), si è presentata con picchi epidemici di difficile spiegazione. Il presente studio di caratterizzazione degli isolati ha dimostrato che un nuovo ceppo ha fatto la sua comparsa nel 2013 negli allevamenti da reddito di polli e tacchini ed ha aumentato la sua diffusione sino a divenire di fatto il ceppo clonale prevalente. Tale ceppo appartiene al sierotipo “1” e al ST 46. Come questo ceppo sia comparso improvvisamente ma pressoché simultaneamente in allevamenti di tacchini e polli da carne dislocati in aree geografiche anche diverse tra loro resta ancora da chiarire. La netta prevalenza di un ceppo clonale negli allevamenti da reddito suggerisce misure di profilassi indiretta mirate.

Tabella 1. Risultati dell'MLST con il numero di ceppi appartenenti a ciascun nuovo sequence type (ST) individuato nel corso del presente studio, e differenziato per specie d'isolamento. T: tacchino; P: pollo; A: anatra; F: faraona; O: oca.

<i>id</i>	<i>country</i>	<i>dnaB</i>	<i>groEL</i>	<i>gyrA</i>	<i>mdh</i>	<i>gluD</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoB</i>	<i>ST</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>O</i>	<i>n° ceppi</i>
188	Italy	3	29	7	5	29	13	18	46	56	13	3	1	0	73
189	Italy	2	3	1	1	1	10	3	47	2	0	0	0	0	2
190	Italy	3	29	8	26	29	12	18	48	1	0	0	0	0	1
191	Italy	5	5	8	5	29	6	18	49	1	0	0	0	0	1
192	Italy	5	6	8	5	29	6	18	50	1	4	0	0	0	5
193	Italy	3	29	8	6	29	12	18	51	2	0	0	0	0	2
194	Italy	3	29	9	5	29	30	18	52	0	1	5	0	1	7
195	Italy	3	29	8	6	29	6	18	53	0	1	0	0	0	1
196	Italy	3	29	10	5	29	30	18	54	0	0	1	0	0	1
197	Italy	2	1	1	7	1	10	22	55	0	1	0	0	0	1
198	Italy	5	6	9	5	29	30	18	56	0	0	1	0	0	1
204	Italy	2	7	12	1	1	10	3	79	0	0	0	2	0	2
203	Italy	2	6	1	1	1	10	3	82	0	0	0	0	1	1

Figura 1. Distribuzione dei ST di ceppi italiani e cinesi caratterizzati tramite MLST.



BIBLIOGRAFIA

1. Christensen H., Bisgaard M. (2010). Phylogenetic relationships of *Riemerella anatipestifer* serovars and related taxa and an evaluation of specific PCR tests reported for *R. anatipestifer*. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1612-1619.
2. Giovannetti L., Pascucci S. (1983). Evoluzione dell'infezione da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino e nel pollo da carne. *La Clinica Veterinaria*, 106, 42-44.
3. Pascucci S., Pacchioni G., Tagliabue S., Giovanetti L., (1981). Infezioni da *Pasteurella anatipestifer* nel tacchino. *La Clinica Veterinaria*, 104, 10-11, 352-354
4. Pascucci S., Giovannetti L., Massi P. (1990). Caratteristiche di ceppi di *Pasteurella anatipestifer* isolati in Italia. *Zootecnica International*, giugno 1990, 50-53.
5. Riemer O. (1904). Short communication about an exudative septicaemia observed in geese and its causative agent. *Zentralblatt Bakteriologie*, 37: 641-648
6. Rimler R.B., Nordholm G.E. (1998). DNA fingerprinting of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Diseases*, 42: 101-105.
7. Rubbenstroth D., Ryll, M., Hotzel H., Christensen H., Knobloch J. K. M., Rautenschlein S., Bisgaard M. (2013). Description of *Riemerella columbipharyngis* sp. nov., isolated from the pharynx of healthy domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica), and emended descriptions of the genus *Riemerella*, *Riemerella anatipestifer* and *Riemerella columbina*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 280-287.
8. Subramaniam S., Chua K.L., Tan H.M., Loh H., Kuhnert P., Frey J. (1997). Phylogenetic position of *Riemerella anatipestifer* based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 562-565.
9. Vancanneyt M., Vandamme P., Segers P., Torck U., Coopman R., Kersters K., Hinz K. H. (1999). *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 289-295.
10. Yu C.Y., Liu Y.W., Chou S.J., Chao M.R., Weng B.C., Tsay J.G., Chiu C.H., Wu C.C., Lin T.L., Chang C.C., Chu C. (2008). Genomic diversity and molecular differentiation of *Riemerella anatipestifer* associated with eight outbreaks in five farms. *Avian Pathology*, 37: 273-279.
11. Zhang Q., Wan C., Li C., Bai X., Liu M., Liu S., Zhang Y. (2017). Evaluation of a quantitative real-time PCR for rapid detection of *Riemerella Anatipestifer* infection in birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(12), 2057-2062.
12. Zhou, B.F., Chao, M., Yang, X.F. and Zhou, D. (2015) Multilocus Sequence Typing of Guangdong isolates of *Riemerella anatipestifer* from Ducks in China. *Open Journal of Animal Sciences*, 5, 332-342.