

INCIDENZA DELLA MORTALITA' EMBRIONALE IN UOVA DA COVA SOTTOPOSTE A VACCINAZIONE "IN OVO"

Bongiorno V.¹, Castellina C.², Ferrazzi V.³, Grilli G.¹

¹ *Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Medicina Veterinaria, via dell'Università 6, 26900 Lodi.*

² *Aglietto Natura s.r.l., viale Roma 9, 13041 Bianzè (Vc).*

³ *Azienda Sanitaria Locale di Vercelli, c.so M. Abbiate 21, 13100 Vercelli.*

Summary

In this research, the incidence of embryonic mortality in hatching eggs vaccinated at 18 days of embryonic life was assessed. More than 10,000 hatching eggs belonging to 3 hybrids for the production of broiler chicks and one for the production of egg chicks were examined; the examination period covered 12 consecutive hatchings; half of the eggs had been vaccinated against Marek's disease, and half had not. Embryonic mortality from the day of vaccination to hatching (18) affected, on average, 6.6% of vaccinated eggs against 7.6 % of unvaccinated eggs with different incidences between hybrids. The abnormal eggs, i.e. contaminated, broken on transfer, malpositioned, pecked and malformed, affected respectively 0.036% in the vaccinated groups and 0.052% in the unvaccinated eggs. There were no significant differences in microbial contamination (bacteria and fungi).

From this work, we can see that in ovo vaccination at 18 days of embryonic life, if well conducted, does not cause damage to the embryo and the hatching yield is comparable.

INTRODUZIONE

Le produzioni avicole rivestono una quota importante nell'approvvigionamento di alimenti a livello mondiale, specialmente per quanto concerne la produzione di carne di pollo (122,5 milioni di tonnellate nel 2018) e di uova (74 milioni di tonnellate nel 2018). Per rispondere prontamente all'incremento dei consumi occorre ottimizzare gli indici produttivi a sostegno di migliori performance degli animali; è fondamentale un approccio integrato dove ogni fattore non venga considerato singolarmente in quanto opera in sinergia o antagonismo con gli altri. Gli interventi da attuare per migliorare le performance produttive riguardano prima di tutto il management degli animali e la loro nutrizione; se non ottimali, non favoriranno la manifestazione del potenziale genetico dei soggetti, punto altrettanto fondamentale e già ampiamente sfruttato nel comparto avicolo (Saeed *et al.*, 2019). Indispensabile è l'attuazione contemporanea di piani di biosicurezza interni ed esterni, per prevenire l'ingresso e la diffusione di patologie in allevamento. Tra i vari momenti produttivi della filiera, l'incubazione delle uova è una fase molto delicata alla quale va dedicata particolare attenzione al fine di ottenere buone percentuali di schiusa e pulcini sani e vitali (Tullett, 2009). Diversi sono i fattori che possono influire sul successo in incubatoio e dipendono sia dall'allevamento di provenienza delle uova, che dal management prima e durante l'incubazione stessa. Negli ultimi anni si sta diffondendo la pratica della vaccinazione in ovo che permette un'immunizzazione

precoce del pulcino e una standardizzazione della vaccinazione con minor uso di manodopera. Le apparecchiature utilizzate però, se non perfettamente regolate, così come la qualità dell'uovo da vaccinare, possono peggiorare le performance di schiusa causando gravi danni all'embrione: Il presente lavoro è stato sviluppato al fine di valutare l'effetto della vaccinazione in ovo sulla schiusa delle uova e sulla mortalità embrionale.

MATERIALI E METODI

La presente ricerca è stata condotta presso un incubatoio piemontese che ha una capacità di schiusa di 200.000/300.000 pulcini a settimana. Le uova provengono da allevamenti di riproduttori di diversi ibridi da carne e da uova, in parte di proprietà dell'azienda e in parte di terzi. La struttura dell'incubatoio presenta una sala stoccaggio, in cui le uova sostano prima di essere incubate, a temperatura e umidità controllate. Sono qui sottoposte a un'attenta selezione da parte del personale: vengono eliminate eventuali uova rotte, sporche o con anomalie e difetti di forma e dimensione; tutte le uova stoccate subiscono un processo di disinfezione. Sono inoltre presenti due sale d'incubazione, un laboratorio, adibito alla detenzione dei vaccini e alla preparazione delle dosi; la sala vaccinazione *in ovo*, dove giungono le uova da sottoporre a questa pratica durante il trasferimento. In questa sala è presente la macchina per la vaccinazione in ovo Embrex Inovoject, questa apparecchiatura è in grado di vaccinare circa 40.000 uova ogni ora ed è presente un doppio sistema di controllo che permette di eliminare le uova non fertili. Successivamente le uova passano in Sala di schiusa, in cui macchine apposite conterranno le uova per gli ultimi tre giorni, periodo entro il quale lo sviluppo embrionale sarà completato. Per la sperimentazione sono state controllate 12 schiuse omogenee per numerosità, in cui erano presenti uova vaccinate e no, deposte da 3 ibridi da carne diversi denominati A, B e C ed un ibrido da uova C. Le uova non schiuse e valutate per ogni schiusa e per ogni ibrido, provenivano direttamente da 3 cestelli da 150 uova vaccinate, denominate "vax" e altrettante non vaccinate, denominate "no vax"; tutte le uova scartate sono state aperte e catalogate per età della mortalità embrionale e per eventuali altre alterazioni visibili (uova rotte, contaminate, con embrione mal posizionato o deforme). A campione, le uova scartate di entrambi i gruppi sono state sottoposte ad analisi microbiologica (batteri e miceti) secondo le metodiche tradizionali.

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il programma SPSS.

RISULTATI

In totale sono state singolarmente analizzate oltre 10.000 uova provenienti da 4 ibridi diversi di cui la metà sottoposte a vaccinazione. La valutazione della mortalità embrionale è stata considerata anche nei periodi precedenti la vaccinazione, sulle uova scartate alla speratura, come evidenziato in tabella I; in questa tabella vengono riportate le medie delle mortalità in % degli ibridi; ai fini della presente ricerca viene considerata importante quella 19-21 giorni.

Tabella I: dati riassuntivi in % tra i gruppi di uova vaccinate o no, dati medi degli ibridi testati

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	0,916667	0,277778	0,638889	7,638889
vax	0,121212	0,30303	0,323232	6,646465

Nello specifico, le percentuali riportate per ogni singolo ibrido sono evidenziate nelle Tabelle II, III, IV e V.

Tabella II: mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido A

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	0,14	0,44	0,81	12,44
vax	0,07	0,59	0,29	11,03

Tabella III: mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido B

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	1,33	0,44	0,44	6
vax	0,06	0,06	0,06	2,22

Tabella IV: mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido C

Mortalità embrionale	1-3 day	4-7 day	8-18 day	19-21 day
no vax	4	0,22	1,11	3,55
vax	0,44	0,22	0,88	5,55

Tabella V: mortalità embrionale delle varie fasi in 5 – Ibrido D

Mortalità embionale	1-3 day	4-7 day	8-17 day	18-21 day
no vax	0	0	0,66	3,77
vax	0	0,22	0,10	4,22

Nessuna differenza tra le 2 tipologie di uova di ogni ibrido ha raggiunto significatività statistica. Alla schiusa sono state segnalate anche le uova anomale, cioè contaminate, rotte al trasferimento, malposizionate, beccate e malformate, che hanno

interessato rispettivamente lo 0,036% nei gruppi “vax” e lo 0,052% nelle uova “no vax”; le differenze sono minime e non significative, nella tabella VI vengono riportate le % specifiche di ogni voce.

Tabella VI: percentuali di uova anomale riscontrate nei 2 gruppi di uova, media degli ibridi

	Vax	no vax
contaminate	23	31
rotte al trasferimento	8	11
malposizionate	19	28
embrione deforme	15	13
beccate	35	17

Le uova contaminate sono state sottoposte ad Wesami microbiologici e non sono state ritrovate differenze statisticamente significative, le specie batteriche ritrovate sono state *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes faecalis*, *Proteus vulgaris* tra i gram negativi e *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylo-sus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis* tra i gram positivi. Tra i miceti sono stati ritrovati *Absidia spp.*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*

DISCUSSIONE

La produzione di pollame è, ormai da anni, un’attività praticata su scala industriale; quindi, per tenere il passo dell’incremento di domanda mondiale di carne avicola, ormai superiore a quella suina, è necessaria l’adozione di tecnologie efficienti sotto il profilo delle pratiche di gestione, selezione genetica, nutrizione e prevenzione delle malattie. Tra queste, la gestione igienico sanitaria e tecnica dell’incubazione è fondamentale per avere una qualità del pulcino ottimale tale da garantire da subito un buon accasamento in allevamento dello stesso. Oltre ai vari parametri da controllare quali sanità ed età dei riproduttori, gestione dell’uovo in allevamento e in incubatoio, vaccinazione del pulcino neonato ecc., negli ultimi anni si è aggiunta anche la possibilità di vaccinare *in ovo*.

Il nostro lavoro voleva valutare principalmente l’impatto di questa pratica sulla mortalità embrionale, prendendo in considerazione varie linee genetiche tra loro. I calcoli sono stati effettuati sul totale delle uova incubate. Tendenzialmente la mortalità embrionale media di ibridi commerciali di polli da carne è tra il 10% e il 16% con variazioni in base all’età dei riproduttori: è minima nelle uova deposte dai giovani riproduttori entro le 45 settimane di età (8% di mortalità embrionale) e massima nei riproduttori di oltre 55/60 settimane di età (fino al 23% di mortalità embrionale) (Peñuela e Hernandez, 2018). In linea generale, considerando solo le morti embrionali, una buona percentuale è rappresentata da soggetti ai primi stadi di sviluppo e da embrioni tra i 18 e i 21 giorni. Questi due periodi, infatti,

sono i più critici. Nei primi giorni si ha una ripresa dello sviluppo embrionale dopo il periodo di conservazione; nell'ultima fase l'embrione si prepara a bucare dapprima le membrane interne e successivamente il guscio, fatto che implica un notevole sforzo e impegno muscolare (Tullett, 2009; Peñuela e Hernandez, 2017). La variazione di mortalità tra i gruppi, dal momento dell'incubazione al momento della vaccinazione (Tab. I) è da considerarsi del tutto casuale in quanto non vi sono variabili che agiscono in maniera differente tra gruppo "vax" e "no vax". La fase di mortalità tra la vaccinazione in ovo e la schiusa (18 e 21 giorni) va analizzata attentamente, in quanto unico scenario in cui si può manifestare un'influenza diretta della pratica vaccinale sulla schiusa. Dai dati ottenuti non emergono differenze tra "vax" e "no vax". Questo dimostra l'efficacia e la sicurezza del metodo che pur essendo all'apparenza "cruento" non influenza negativamente la schiusa offrendo unicamente vantaggi (Sokale et al., 2016). Tra i principali troviamo: copertura anticorpale precoce senza interferenza con l'immunità materna; maggiore velocità nella gestione della profilassi vaccinale; riduzione dei costi di manodopera; minor rischio per gli operatori; maggiore precisione ed efficienza nello svolgimento delle attività, somministrazione di più vaccini, che con questo metodo può avvenire in un solo passaggio (Peebles, 2018; Saeed et al., 2019). Diversi studi dimostrano, inoltre, differenze in positivo su parametri valutati post schiusa, tra cui: peso corporeo, indice di conversione alimentare, incremento ponderale, mortalità ridotta (Sokale et al., 2017). Per quanto riguarda i singoli ibridi (tabb. II, III, IV e V) non emergono differenze tra le uova "vax" e "no vax" mentre sono evidenti delle differenze tra ibridi. L'ibrido A, rappresentato nella tab. II, mostra una mortalità dell'ultimo periodo mediamente più alta rispetto agli altri ibridi probabilmente legata all'età dei riproduttori che erano nelle ultime settimane di deposizione. E' noto, infatti, che le uova deposte da riproduttori verso fine carriera sono caratterizzate da un aumento della mortalità embrionale (Peñuela e Hernandez, 2017), legata soprattutto alla maggiore perdita di umidità delle uova (McDaniel et al., 1979). Nella tab. III viene invece considerato un ibrido commerciale da carne ad accrescimento rapido. Visivamente sono più evidenti le differenze tra uova vaccinate e no, sebbene statisticamente non siano significative. La Tab. IV considera un altro ibrido da carne ad accrescimento rapido. E' subito evidente quanto, in questo caso, sia maggiormente incidente la percentuale di mortalità delle uova "vax" senza però raggiungere una significatività statistica. La tab. V riporta l'ultima informazione sul singolo ibrido che è qui a produzione di uova a guscio chiaro; anche in questo caso la mortalità nelle uova "vax" è leggermente superiore senza raggiungere significatività statistica. Per quanto riguarda le uova considerate anomale, le percentuali assolute sono sicuramente basse e da considerarsi nella norma anche se alcuni parametri inferiori nelle uova "vax" (malposizionate, rotte al trasferimento) fanno pensare ad una maggiore attenzione degli operatori nel selezionare le uova destinate alla vaccinazione. Per quanto riguarda le uova beccate o "pipped" invece la percentuale nelle uova "vax" è più elevata. Le cause possono essere diverse ma nel nostro caso si può ipotizzare che in queste uova l'introduzione dell'ago possa avere in qualche modo toccato, e quindi lesionato, i muscoli del collo che sono quelli deputati a sopportare lo sforzo della rottura del guscio alla nascita. Per quanto riguarda le uova contaminate, sempre percentualmente molto basse, in entrambi i gruppi, come potevamo ipotizzare, sono presenti gli stessi batteri

e miceti. Non è stata riscontrata la presenza di batteri considerati patogeni, tra cui *Salmonella* spp., *E. coli* e *Staphylococcus aureus* che vengono segnalati dalla maggior parte degli Autori come un pericolo (Gehan, 2009). Una nota va fatta per la presenza di *Enterococcus faecalis* che fa parte della normale flora batterica della gallina, ma che potenzialmente può dare patologia al pulcino in quanto ritenuto responsabile di artropatia amiloide e di altre patologie (Fertner et al., 2011; Blanco et al., 2017)).

Dai dati di contaminazione micotica delle uova si può affermare che la situazione riscontrata è positiva dal momento in cui non si è mai rilevata la presenza di *Aspergillus fumigatus*. Questa specie fungina, infatti, viene considerata molto pericolosa per le sue caratteristiche di infettività e patogenicità sugli embrioni e sui pulcini neonati (Arné et al., 2011; Munir et al., 2017). I miceti maggiormente presenti sono *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp., ovvero microrganismi la cui presenza è tipica del bioaerosol (Comi, 2009). Diversi autori confermano l'identificazione degli stessi generi fungini in ricerche condotte negli incubatoi avicoli di altri paesi (Eckman e Morgan-Jones, 1979).

CONCLUSIONI

L'avicoltura è un comparto produttivo dalle elevate potenzialità. Come settore in crescita trae beneficio da innovazioni tecnologiche che ne velocizzano i processi. Devono essere soddisfatte le richieste del consumatore e le esigenze di un mercato in continua espansione. D'altra parte, sempre maggiori sono le pressioni in merito alla riduzione dell'uso di antibiotici, con impatto rilevante sull'opinione pubblica (Luhmann e Theuvsen, 2017; Mehdi et al., 2018). La profilassi vaccinale, di per sé tecnica preventiva, ha offerto e continua a offrire un contributo importante per il contenimento delle patologie. La vaccinazione in ovo si sta diffondendo e viene utilizzata in un numero crescente di incubatoi anche in Europa. Uno dei principali punti di forza che stimola l'uso di questo sistema è il numero crescente di vaccini adatti al metodo; tra questi sono compresi i moderni vaccini vettoriali che offrono una protezione precoce contro diverse malattie in contemporanea e vaccini con immunocomplessi che possono essere somministrati in presenza di anticorpi materni (Peebles, 2018; Saeed et al., 2019). La vaccinazione individuale di embrioni durante il trasferimento dall'incubatrice alla schiusa è molto meno laboriosa rispetto alla vaccinazione sottocutanea o intramuscolare di pulcini di un giorno, in quanto completamente robotizzata. Va ricordato però che la vaccinazione in ovo non è un evento, ma la fase di un processo. Considerare attentamente i fattori interni all'incubatoio è fondamentale, perché anche se non direttamente collegati all'intervento vaccinale possono influenzarne l'esito. Dall'esperienza qui riportata, si evince che un impianto gestito correttamente, come nel nostro caso, non comporti nessun effetto negativo sulla mortalità embrionale, in accordo con quanto dimostrato recentemente anche da Sokale et al., (2017). Nonostante ciò, ci possono essere dei margini di miglioramento: una maggiore attenzione da parte degli operatori permetterebbe una riduzione del numero di uova mal posizionate (capovolte); inoltre, una taratura più precisa della macchina sulla base delle dimensioni delle uova deposte dai diversi riproduttori, sarebbe utile per ridurre le possibili lesioni provocate dall'inserimento degli aghi nelle uova.

BIBLIOGRAFIA

1. Arné P, Thierry S, Wang, D, Deville M, Leloc'h G, Desoutter A, Femenia F, Nieguitisila A, Huang W, Chermette R, Guillot J, (2011). *Aspergillus fumigatus* in Poultry. International Journal of Microbiology, doi:10.1155/2011/74635.
2. Blanco, A.E., Barz, M., Caverio, D., Icken, W., Sharifi, A.R., Voss, M., Preisinger, R. & Buxadé, C. (2017). Chicken embryo lethality assay for determining the lethal dose and virulence of *Enterococcus faecalis*. Avian Pathology, 46, 548–555.
3. Comi G., (2009). Microbiologia dell'aria, Modena Fiere, Convegno Sicura.
4. Eckman M. K, Morgan-Jones G, (1979). Fungus Species Isolated from Commercial Hatcheries in Alabama. Avian Diseases No. 1 (Jan. - Mar.), 23: 204-208.
5. Fertner ME, Olsen RH, Bisgaard M, Christensen H. (2011). Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. Acta Vet Scand. 53(1): 56
6. Gehan Z.M. (2009). A new approach to evaluate the hygienic condition of commercial hatcheries. Int. J. of Poultry Science, 8:1047-1051.
7. Luhmann H, Theuvsen L. (2017). Analyzing consumer preferences for CSR-activities by German poultry producers with adaptive conjoint analysis. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2: 349–359.
8. McDaniel GR, Roland DA, Coleman MA. (1979). The effect of eggshell quality on hatchability and embryonic mortality. Poult Sci, 58:10-13.
9. Mehdi Y, Létourneau-Montminy M, Gaucher M, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA, Godbout S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: global impacts and alternatives. Anim Nutr, 4: 170-178.
10. Munir MT, Rehman ZU, Shah., Umar S, (2017). Interactions of *Aspergillus fumigatus* with the respiratory system in poultry, World's Poultry Science Journal, 3(2): 321-336.
11. Peebles ED. (2018) In ovo applications in poultry: a review. Poult Sci, 97: 2322–2338.
12. Peñuela AS, Hernandez AV. (2018). Characterization of embryonic mortality in broilers. Rev MVZ Cordoba, 23: 6500-6513.
13. Saeed M, Babazadeh D, Naveed M, Alagawany M, El-Hack M, A-Arain M, Chaoa S, Dhama K, E-Abd, Karthik K, S-Elnesrk S, Sachan S, Tiwari R. (2019). In ovo delivery of various biological supplements, vaccines and drugs in poultry: current knowledge. J Sci Food Agric, 99: 3727–3739.
14. Sokale AO, Zhai W, Pote LM, Williams CJ, Peebles ED. (2017). Effects of coccidiosis vaccination administered by in ovo injection on Ross 708 broiler performance through 14 days of post-hatch age. Poult Sci, 96: 2546–2551.
15. Tullett S. (2009) ROSS TECH, Controlli in incubatoio. Aviagen