

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi

Ciclo XXIII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: VET 05

**COLIBACILLOSI NEL TACCHINO DA CARNE:
RUOLO PREDISPONENTE DI *METAPNEUMOVIRUS* AVIARE
E DEL VIRUS DELL'ENTERITE EMORRAGICA**

Presentata da: Davide Giovanardi

Coordinatore Dottorato
Prof. Giovanni Poglayen

Relatore
Prof.ssa Elena Catelli

Esame finale anno 2011

INDICE

INTRODUZIONE	1
PARTE GENERALE	3
Capitolo 1. Cenni sull'allevamento del tacchino in Italia	5
Capitolo 2. Infezione da <i>Metapneumovirus</i> aviare	7
2.1 Eziologia	7
2.1.1 Classificazione e tipizzazione	7
2.1.2 Morfologia	7
2.1.3 Composizione proteica	8
2.1.4 Sensibilità ad agenti chimici e fisici	8
2.2 Patobiologia ed epidemiologia	9
2.2.1 Incidenza e distribuzione geografica	9
2.2.2 Ospiti naturali	10
2.2.3 Modalità di trasmissione	10
2.2.4 Patogenesi	10
2.2.5 Segni clinici, morbilità e mortalità	11
2.2.6 Lesioni anatomopatologiche	11
2.2.6.1 Lesioni macroscopiche	11
2.2.6.2 Lesioni microscopiche	12
2.2.7 Immunità	12
2.2.7.1 Immunità cellulo-mediata	12
2.2.7.2 Immunità umorale	12
2.2.7.3 Immunità passiva	12
2.3 Diagnosi	13

2.3.1	Isolamento e identificazione	13
2.3.1.1	Isolamento su TOC	13
2.3.1.2	Isolamento su uova embrionate	13
2.3.1.3	Identificazione virale	14
2.3.2	Immunofluorescenza e immunoperossidasi	14
2.3.3	Tecniche biomolecolari	14
2.3.4	Sierologia	15
2.3.4.1	ELISA	16
2.3.4.2	Sieroneutralizzazione	16
2.3.4.3	Immunofluorescenza indiretta	16
2.4	Strategie di controllo	16
2.4.1	Eradicazione	16
2.4.2	Vaccinazione	16
2.4.2.1	Vaccini vivi attenuati e vaccini inattivati	17
2.4.2.2	Cross protezione tra sottotipi diversi	17
2.4.2.3	Reversione a virulenza di ceppi vaccinali	17
2.4.2.4	Vaccini ricombinanti	18
Capitolo 3. Enterite emorragica del tacchino		19
3.1	Eziologia	19
3.1.1	Classificazione e tipizzazione	19
3.1.2	Morfologia	19
3.1.3	Composizione chimica	20
3.1.4	Sensibilità ad agenti chimici e fisici	20
3.2	Patobiologia ed epidemiologia	20
3.2.1	Incidenza e distribuzione geografica	20
3.2.2	Ospiti naturali e sperimentali	20
3.2.3	Modalità di trasmissione	21
3.2.4	Patogenesi	21
3.2.5	Segni clinici, morbilità e mortalità	22

3.2.6	Lesioni anatomopatologiche	22
3.2.6.1	Lesioni macroscopiche	22
3.2.6.2	Lesioni microscopiche	22
3.2.7	Immunità	23
3.2.7.1	Attiva	23
3.2.7.2	Passiva	23
3.3	Diagnosi	23
3.3.1	Isolamento e identificazione	23
3.3.2	PCR	24
3.3.3	Sierologia	24
3.3.3.1	Agar Gel Immunodiffusione (AGID)	24
3.3.3.2	ELISA	24
3.4	Strategie di controllo	25
3.4.1	Vaccinazione	25

Capitolo 4. Colibacillosi da *Avian Pathogenic*

<i>Escherichia coli</i> (APEC)	26	
4.1	Eziologia	26
4.1.1	Classificazione	26
4.1.2	Morfologia e colorazione	27
4.1.3	Condizioni di crescita	27
4.1.4	Crescita su terreni di coltura	27
4.1.5	Proprietà biochimiche	27
4.1.6	Sensibilità ad agenti chimici e fisici	28
4.1.7	Struttura antigene	28
4.1.7.1	Antigeni Somatici (O)	28
4.1.7.2	Antigeni Flagellari (H)	28
4.1.7.3	Antigeni Capsulari (K)	29
4.1.7.4	Antigeni F (Pili)	29

4.1.8	Tipizzazione	29
4.1.8.1	Sierotipo	29
4.1.8.2	Resistotipo	29
4.1.8.3	Genotipo	30
4.1.8.4	Patotipo	31
4.1.8.4.1	Fimbrie tipo 1	31
4.1.8.4.2	Fimbrie tipo P	31
4.1.8.4.3	Resistenza al siero	32
4.1.8.4.4	Sistemi di acquisizione del ferro	32
4.1.8.4.5	Agglutinina Termosensibile (<i>Thermo sensitive haemoagglutin</i> – TSH)	33
4.1.8.4.6	Colicine	33
4.1.8.4.7	Capsula batterica	33
4.2	Epidemiologia e Patobiologia	34
4.2.1	Incidenza e distribuzione geografica	34
4.2.2	Ospiti naturali e sperimentali	34
4.2.3	Modalità di trasmissione	35
4.2.4	Fattori predisponenti	35
4.2.5	Patogenesi	35
4.2.6	Segni clinici, morbilità e mortalità	36
4.2.7	Lesioni anatomo-patologiche	36
4.2.7.1	Colisetticemia di origine respiratoria	37
4.2.7.2	Colisetticemia di origine enterica	37
4.2.7.3	Osteoartrite e sinovite	38
4.3	Diagnosi	38
4.4	Profilassi e controllo della malattia	39
4.4.1	Interventi di management	39
4.4.2	Vaccinazione	39
4.4.2.1	Vaccini inattivati	39
4.4.2.2	Vaccini vivi attenuati mutanti	40

4.4.3	Trattamento	40
4.4.3.1	Farmaci antimicrobici	40
4.4.3.2	Altri trattamenti	41
Capitolo 5. Interazione tra agenti infettivi		43
PARTE SPERIMENTALE		45
Studio A		
STUDIO PILOTA:		
RISPOSTA ANTICORPALE DEL TACCHINO ALLA		
SOMMINISTRAZIONE DI VACCINI COMMERCIALI		
PER HEV ED AMPV		
A.1	Introduzione	47
A.2	Materiali e metodi	47
A.2.1	Animali utilizzati nella prova	47
A.2.2	Vaccini	47
A.2.3	Piano sperimentale	48
A.2.4	ELISA per HEV	48
A.2.5	ELISA per AMPV	48
A.3	Risultati	49
A.4	Discussione	50

Studio B

INTERAZIONE TRA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE*, VIRUS DELL'ENTERITE EMORRAGICA ED *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO DA CARNE

B.1	Introduzione	51
B.2	Materiali e metodi	52
B.2.1	Allevamento oggetto dell'indagine	52
B.2.2	Campionamento	52
B.2.2.1	Tamponi	52
B.2.2.2	Prelievi di sangue per esami sierologici	52
B.2.2.3	Registrazione sintomatologia clinica, mortalità ed esami necroscopici	53
B.2.2.4	Prelievi da carcasse	53
B.2.2.5	Numeri di accettazione	53
B.2.3	RT nested-PCR specifica per AMPV sottotipo A e B	53
B.2.4	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) per discriminare fra ceppi di campo da ceppi vaccinali	54
B.2.5	Isolamento di AMPV	54
B.2.6	PCR per HEV	54
B.2.7	ELISA per la ricerca degli anticorpi per HEV e AMPV	55
B.2.8	ELISA per la ricerca degli anticorpi per MG e MS	55
B.2.9	Esami batteriologici per <i>E. coli</i>	55
B.2.9.1	Prelievo da campioni d'organo ed essudati	55
B.2.9.2	Semina, isolamento e tipizzazione di <i>E. coli</i>	56
B.2.9.3	Tipizzazione sierologica di <i>E. coli</i>	56
B.3	Risultati	57
B.3.1	CICLO I	57

B.3.1.1 Sintomatologia clinica, mortalità e lesioni necroscopiche	57
B.3.1.2 RT nested-PCR AMPV, isolamento e differenziazione dei ceppi vaccinali	58
B.3.1.3 PCR per HEV	58
B.3.1.4 ELISA per HEV, AMPV, MG e MS	59
B.3.1.5 Isolamento e sierotipizzazione di <i>E. coli</i>	60
B.3.2 CICLO II	61
B.3.2.1 Sintomatologia clinica, mortalità e lesioni necroscopiche	61
B.3.2.2 RT nested-PCR per AMPV, isolamento e differenziazione dei ceppi vaccinali	62
B.3.2.3 PCR per HEV	62
B.3.2.4 ELISA per HEV, AMPV, MG e MS	63
B.3.2.5 Isolamento e sierotipizzazione di <i>E. coli</i>	64
B.3.3 CICLO III	65
B.3.3.1 Sintomatologia clinica, mortalità e lesioni necroscopiche	65
B.3.3.2 RT nested-PCR di AMPV e differenziazione dei ceppi vaccinali	65
B.3.3.3 PCR per HEV	65
B.3.3.4 ELISA per HEV, AMPV, MG e MS	66
B.3.3.5 Isolamento e sierotipizzazione di <i>E. coli</i>	67
B.4 Discussione	67

Studio C

EPIDEMIOLOGIA DEGLI APEC NEL TACCHINO DA CARNE

C.1 Introduzione	69
C.2 Materiali e metodi	69
C.2.1 Ceppi batterici	69
C.2.2 Analisi della sensibilità agli antibiotici (resistotipo)	69

con test di Kirby-Bauer	
C.2.3 PCR per l'amplificazione dei geni di virulenza di <i>E.coli: iucD, tsh, papC, fimC, fyuA e irp-2</i> (patotipo)	70
C.2.4 RAPD-PCR	71
C.3 Risultati	72
C.3.1 CICLO I	72
C.3.1.1 Resistotipo	72
C.3.1.2 Patotipo	73
C.3.1.3 RAPD-PCR	74
C.3.2 CICLO II	75
C.3.2.1 Resistotipo	75
C. 3.2.2 Patotipo	76
C.3.2.3 RAPD-PCR	77
C.3.3 CICLO III	78
C.3.3.1 Resistotipo	78
C.3.3.2 Patotipo	79
C.3.3.3 RAPD-PCR	80
C.4 DISCUSSIONE	81
DISCUSSIONE GENERALE	
E CONCLUSIONI	83
BIBLIOGRAFIA	87
RINGRAZIAMENTI	111

INTRODUZIONE

Per colibacillosi aviare si intende qualsiasi infezione localizzata o sistemica causata da *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) in grado di generare varie forme patologiche (es. setticemia, peritonite, cellulite, sinovite, ecc.) sempre più frequentemente segnalate nel mondo come causa sia di mortalità a livello di allevamento che di scarto alla macellazione (Barnes *et al.*, 2008). La maggior parte delle specie aviari è sensibile alle colibacillosi, anche se le manifestazioni cliniche sono riportate più spesso in polli, tacchini e anatre, con lesioni di gravità più elevata nei soggetti giovani (Marien *et al.*, 2005).

Nell'allevamento del tacchino da carne, molteplici possono essere gli agenti eziologici primari, di origine infettiva e non, in grado scatenare episodi gravi di mortalità da colibacillosi. Sebbene sia noto il potere patogeno intrinseco degli APEC, le infezioni singole, non associate cioè ad altri fattori eziologici predisponenti (virus, micoplasmi, agenti immunodepressori, condizioni ambientali) sono un'eccezione (Pierson *et al.*, 1996a). In particolare, si ritiene che virus immunosoppressivi, quale il virus dell'enterite emorragica del tacchino (*hemorrhagic enteritis virus* – HEV), o respiratori, come *Avian Metapneumovirus* (AMPV), abbiano un ruolo fondamentale.

L'azione predisponente di AMPV è stata dimostrata in studi sperimentali nei confronti di infezioni batteriche da *Escherichia coli* e *Bordetella avium* (Cook *et al.*, 1991), micoplasmi (Naylor *et al.*, 1992), *Ornithobacterium rhinotracheale* (Marien *et al.*, 2005), *Chlamydophila psittaci* (Van Loock *et al.*, 2006) e *Riemerella anatipestifer* (Rubbenstroth *et al.*, 2007).

L'azione immunodepressiva di HEV predisponente alla colibacillosi è stata dimostrata sia in condizioni sperimentali (Larsen, *et al.*, 1985, Newberry *et al.*, 1993), sia in allevamento (Sponenberg *et al.*, 1985). Da ultimo, evidenze di campo suggeriscono che HEV possa interagire con AMPV nello scatenare episodi di colibacillosi nei tacchini riproduttori in ovodeposizione (Ceruti *et al.*, 2007).

È chiaro che una corretta ed efficace profilassi nei confronti di questi due virus riduce le manifestazioni di colibacillosi. Nel tacchino si attuano costantemente profilassi vaccinali per queste infezioni virali, benché la loro efficacia sia attualmente discussa e/o poco documentata. L'efficacia dei vaccini vivi per AMPV, sia sottotipo A che B, è attualmente in valutazione alla luce dei recenti studi di campo e sperimentali di Catelli *et al.* (2006 e 2010), che ne evidenziano alcuni limiti. Questi vaccini, essendo stati sviluppati ormai vent'anni fa, non sono in grado di fornire una completa protezione verso i ceppi virali attualmente circolanti in Italia (Cecchinato *et*

al. 2010) ed in alcuni casi hanno mostrato tendenza alla rivirulentazione (Catelli et al., 2006). D'altro canto, l'utilizzo del vaccino inattivato per HEV (il solo autorizzato in Italia) è atipico nel panorama internazionale, dove vengono utilizzati presidi vivi preparati da colture cellulari o da milze di soggetti infettati sperimentalmente.

Gli studi riportati nella presente tesi approfondiscono la possibile triplice interazione fra i suddetti agenti virali e APEC nel tacchino da carne in Italia, dove sia l'enterite emorragica che le infezioni da *Metapneumovirus* sono endemiche e la colibacillosi è segnalata come principale causa di mortalità. La ricerca ha previsto l'allestimento iniziale di uno studio pilota per valutare la sierconversione da vaccinazione per HEV e AMPV e, successivamente, tre studi longitudinali consecutivi in allevamento per evidenziare la presenza di AMPV, HEV e APEC durante il ciclo produttivo e la loro eventuale interazione nel determinismo della mortalità da colibacillosi. Inoltre si è voluto approfondire l'epidemiologia degli APEC mediante caratterizzazione genomica e determinazione del patotipo e del profilo di antibiotico-resistenza dei ceppi.

PARTE GENERALE

Capitolo 1

Cenni sull'allevamento del tacchino in Italia

Il tacchino (*Meleagris gallopavo*) è originario dell'America settentrionale e del Messico, dove era già allevato ai tempi degli Aztechi. Arrivato in Europa nel 1519 al seguito degli Spagnoli, trovò nell'Ordine dei Gesuiti un instancabile promotore diffondendosi nelle principali corti europee. L'allevamento del tacchino in Italia ha avuto un grande impulso nel corso della seconda metà del XX secolo, tanto che la sua carne è diventata un alimento di largo consumo grazie ai sistemi produttivi integrati. Nel 2010 in Italia sono state prodotte 279.300 tonnellate di carne di tacchino, con un consumo *pro-capite* pari a 3,9 kg (UNA, 2010).

Sebbene l'allevamento del tacchino sia in costante ritardo (a livello non solo italiano ma anche europeo) rispetto a quello del pollo, negli ultimi sessant'anni i parametri produttivi del tacchino sono notevolmente migliorati. Nei primi anni '40 i tacchini maschi impiegavano circa 24 settimane per raggiungere 8,3 kg di peso vivo, negli anni '60 arrivavano a 9 kg in 20 settimane, negli anni '80 raggiungevano 16 kg in 20 settimane, e finalmente oggi arrivano a 18 kg a 20 settimane di età. Un andamento analogo ha subito l'indice di conversione, che è passato da 4,5 a 2,99 (Cavalchini, 2003; Douglas, 2010).

I tacchini allevati a scopo commerciale non appartengono più, in genere, a razze vere e proprie, ma sono ibridi ottenuti dall'incrocio di linee genetiche a tre o quattro vie, opportunamente selezionate per il miglioramento delle caratteristiche funzionali. Sono disponibili ibridi con caratteristiche diverse (sebbene in Italia negli ultimi anni ci si sia orientati verso l'allevamento di un solo ibrido), studiati appositamente per incontrare le differenti richieste di mercato dei vari Paesi. Gli ibridi sono molto uniformi e hanno una produttività spesso maggiore delle linee genetiche di partenza, unitamente ad un vigore e ad una rusticità più elevati.

Le tecniche di allevamento del tacchino possono essere suddivise in: allevamento familiare, allevamento estensivo e, naturalmente, allevamento intensivo, oggetto della presente ricerca. In quest'ultima tipologia produttiva tacchini sessati di un giorno d'età vengono accasati in allevamenti monosesso, oppure in allevamenti cosiddetti misti, dove i due sessi vengono comunque mantenuti separati. L'allevamento intensivo è condotto utilizzando capannoni di tipo avicolo, a ventilazione naturale o forzata (con ventilatori in estrazione o utilizzati come movimentatori d'aria), all'interno dei quali può essere svolto l'intero ciclo produttivo dalla pulcinaia al finissaggio, variando opportunamente la densità dei soggetti con il crescere degli stessi. Gli animali vengono macellati, tenendo conto delle esigenze di mercato, ad un'età di 14

settimane per le femmine e di 20 settimane per i maschi. Il peso vivo raggiunto dai tacchini a tale età può variare anche di molto a seconda del tipo di ibrido utilizzato, del tipo di conduzione, dello stato sanitario e soprattutto della stagione di allevamento. In Italia, a prescindere dal tipo di conduzione dell'allevamento (soccida, conduzione diretta), viene adottato il sistema chiamato "*all in-all out*", vale a dire "tutto pieno-tutto vuoto". Questo sistema prevede che i capannoni vengano completamente svuotati a fine ciclo e che, per un periodo compreso tra la fine di un ciclo produttivo e l'inizio del successivo, in allevamento non siano presenti animali. In seguito ai recenti casi di influenza aviaria, per legge questo periodo non deve avere durata inferiore a 21 giorni.

Capitolo 2

Infezione da *Metapneumovirus* aviare

2.1 Eziologia

2.1.1 Classificazione e tipizzazione

Il *Metapneumovirus* aviare (*Avian Metapneumovirus*-AMPV) è un membro della famiglia *Paramyxoviridae*, sottofamiglia *Pneumovirinae*, genere *Metapneumovirus*. In passato studi di sieroneutralizzazione, ELISA e di profilo polipetidico indicavano come fossero presenti poche differenze tra i ceppi isolati in Europa (Baxter-Jones *et al.*, 1989; Gough e Collins, 1989). Più recentemente i *Metapneumovirus* aviari sono stati ulteriormente classificati in quattro sottotipi (A, B, C e D) sulla base della sequenza nucleotidica e aminoacidica (Cook e Cavanagh, 2002). L'utilizzo di anticorpi monoclonali ha permesso di evidenziare differenze antigeniche elevate tra i ceppi (Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993), e un'ulteriore conferma delle differenze tra i sottotipi è stata ottenuta mediante l'analisi nucleotidica della glicoproteina G, che ha evidenziato due sottotipi, designati come A e B, all'interno dello stesso sierogruppo (Juhasz e Easton, 1994). Ceppi AMPV sottotipo C isolati in tacchini negli Stati Uniti in Colorado e in Minnesota, attraverso test di neutralizzazione non hanno mostrato una significativa relazione sierologica con ceppi appartenenti ai sottotipi A e B isolati in Europa (Cook *et al.*, 1999). Analisi molecolari dei geni codificanti le proteine virali dei ceppi europei ed americani, hanno rilevato che i virus del sottotipo C hanno più del 90% di omologia nucleotidica tra loro e solo il 40 % e il 70 % con quelli del sottotipo A e B, rispettivamente (Stuart *et al.*, 1989). Studi di comparazione filogenetica dei quattro sottotipi hanno mostrato che A, B e D sono tra loro più vicini rispetto al sottotipo C (Bayon-Auboyer *et al.*, 2000).

2.1.2 Morfologia

AMPV è un virus ad RNA a singolo filamento non segmentato e a polarità negativa. È un virus pleomorfo, con nucleocapside a simmetria elicoidale ed è provvisto di *envelope* esterno. Al microscopio elettronico si osservano particelle virali altamente pleomorfe, che a volte si presentano sferiche o possono avere lunghe proiezioni filamentose. Di norma si osservano strutture tondeggianti di diametro variabile tra 50 e 200 nm (Easton *et al.*, 2004). AMPV non possiede capacità emoagglutinante nei confronti degli eritrociti aviari e neppure attività neuroaminidasica (Gough e Jones, 2008).

2.1.3 Composizione proteica

AMPV possiede otto proteine strutturali:

- Nucleoproteina N, strutturale del nucleocapside, di peso pari a 38-43 kDa (Easton *et al.*, 2004);
- Proteina M di matrice, di 30-35 kDa, associata alla membrana interna lipidica delle cellule infettate, che media l'assemblaggio fra il complesso del nucleocapside e l'envelope virale;
- Fosfoproteina (proteina P);
- Proteina L, polimerasi RNA-dipendente che partecipa alla sintesi e trascrizione virale (Broor e Bharaj, 2007);
- Proteina seconda di matrice (M2) di 22 kDa;
- Proteina G di attacco, che permette l'adsorbimento del virus alla cellula ospite;
- Proteina F di fusione, che causa la fusione dell'*envelope* con la membrana cellulare, determinando la liberazione del nucleocapside nel citoplasma (Broor e Bharaj, 2007);
- *Small hydrophobic protein* (proteina SH), con funzione poco conosciuta, anche se studi recenti ipotizzano una sua azione favorente la sopravvivenza *in vitro* di AMPV. Questa azione potrebbe avere un ruolo importante nel processo di fusione virale con la cellula (Ling *et al.*, 2008).

Le proteine G e F sono superficiali e rappresentano i principali determinanti antigenici.

2.1.4 Sensibilità ad agenti chimici e fisici

In Europa, studi relativi ai sottotipi A e B hanno evidenziato come questi virus siano stabili a pH compreso tra 3 e 9, ma vengano inattivati ad una temperatura di 56 °C in 30 minuti. Vista la presenza dell'*envelope*, questi virus sono sensibili ai solventi lipidici quali l'etere e il cloroformio (Collins *et al.*, 1986). Più recentemente, negli Stati Uniti, Townsend *et al.* (2000) hanno dimostrato che AMPV sottotipo C può sopravvivere per un'ora a pH compreso tra 5 e 9, e che questo virus viene inattivato in 12 settimane a 4 °C, in 4 settimane a 20 °C, in due giorni a 37 °C e in meno di 6 ore a 50 °C. Dopo essiccamento a temperatura ambiente, AMPV è invece rimasto vitale per 7 giorni. Gli stessi Autori hanno inoltre rilevato che numerosi disinfettanti sono efficaci nell'inattivazione del virus; tra questi vi sono i sali quaternari d'ammonio, l'etanolo, gli iodofori e i derivati del fenolo. Altri studi condotti da Velayudhan *et al.* (2003), relativamente al sottotipo C, hanno confermato la presenza dell'RNA virale nella lettiera stoccata a 8 °C per 90 giorni e la sopravvivenza del virus fino a 60 giorni ad una temperatura di -12 °C.

2.2 Patobiologia ed epidemiologia

2.2.1 Incidenza e distribuzione geografica

Con la sola eccezione dell'Oceania, la presenza di AMPV è stata segnalata in tutte le principali aree di allevamento di pollame del mondo. I sottotipi A e B sono i più diffusi, essendo presenti in Europa, Asia, Centro e Sud America ed inoltre in Africa (Gough e Jones, 2008).

La presenza di questo virus è stata riportata per la prima volta nel tacchino in Sud Africa circa trent'anni fa (Buys e Du Preez, 1980), per poi essere segnalata in numerosi altri Paesi, tra i quali la Francia (Andral *et al.*, 1985) e la Germania (Hafez e Woernle, 1989).

In Italia la prima segnalazione di AMPV è relativa al tacchino (Fabris e D'aprile, 1990), mentre successivamente l'infezione è stata riportata anche nel pollo, nel fagiano e nella faraona (Cordioli *et al.*, 1990; Catelli e Lavazza, 2000; Catelli *et al.*, 2001).

Nel continente americano, e più precisamente negli Stati Uniti, la prima segnalazione risale alla fine degli anni Novanta, quando Senne *et al.* (1997) isolarono il virus in Colorado da tacchini che presentavano una forma respiratoria ad alta diffusibilità. Questi Autori identificarono un nuovo sottotipo del virus, denominato C. L'epidemia si esaurì dopo un anno e si diffuse in Minnesota, Iowa, Wisconsin, Nord e Sud Dakota anche negli uccelli selvatici (Bennett *et al.*, 2002). AMPV C è stato isolato anche recentemente in Francia (Toquin *et al.*, 2006) e in Corea (Lee *et al.*, 2007).

AMPV sottotipo D (inizialmente denominato non-A/non-B) è stato isolato in Francia nel 1985 ma, a differenza degli altri sottotipi, non sono mai state segnalate infezioni di campo (Bayon-Auboyer *et al.*, 2000).

Juhasz e Easton (1994) hanno segnalato che in Italia i primi AMPV isolati appartenevano sempre al sottotipo B. In questi ultimi anni, le infezioni da AMPV nel nostro Paese sono state ampiamente documentate attraverso indagini epidemiologiche dapprima svolte in aree del Veneto ad elevata vocazione avicola, e successivamente estese ad allevamenti del centro Italia. Queste hanno confermato l'ampia diffusione del sottotipo B ed hanno inoltre evidenziato, per la prima volta nel 2003, la presenza del sottotipo A (Cecchinato *et al.*, 2003; Catelli *et al.*, 2004 e 2006).

La vaccinazione di massa dei tacchini da carne eseguita via spray in incubatoio, a partire dall'inizio dello scorso decennio, sembra avere influenzato la dinamica dell'infezione, con riduzione degli isolamenti precoci di AMPV ed un aumento della frequenza di quelli tardivi (Catelli *et al.*, 2010). Sono stati segnalati anche focolai causati dagli stessi ceppi vaccinali capaci di revertire a virulenza (Catelli *et al.*, 2006; Ricchizzi *et al.*, 2008).

2.2.2 Ospiti naturali

Ad ogni età, pollo e tacchino sono ospiti naturali di AMPV (Gough e Jones, 2008). Il tacchino viene colpito da forme respiratorie più gravi rispetto al pollo e in questa specie AMPV viene anche denominato virus della Rinotracheite del Tacchino (*Turkey Rhinotracheitis Virus – TRTV*) (Gough e Jones, 2008).

Picault *et al.* (1987) hanno riscontrato titoli anticorpali nelle faraone e sono riusciti a riprodurre lesioni di rinotracheite in questa specie con ceppi virali isolati da tacchini. Nella faraona (Kles *et al.*, 1987) e nel fagiano (Ogawa *et al.*, 2001) sono state riportate sintomatologia e lesioni simili a quelle della Sindrome della testa gonfia (*Swollen Head Syndrome-SHS*) del pollo.

I piccioni, le anatre e le oche sono considerate specie refrattarie all'infezione (Gough e Jones, 2008).

2.2.3 Modalità di trasmissione

Il virus persiste per un breve periodo nell'ospite, facendo ipotizzare che il contagio possa verificarsi per poco tempo dopo l'infezione attraverso il contatto tra animali infetti e animali sensibili con scambio di essudato contenente AMPV fino a 9 giorni post-infezione (Cook *et al.* 1991).

Non esiste nessuna prova scientifica che AMPV possa essere trasmesso verticalmente anche se sono stati riscontrati alti titoli virali nell'apparato riproduttore di polli in deposizione (Jones *et al.*, 1988; Kehra e Jones, 1999).

2.2.4 Patogenesi

La trasmissione del virus avviene per via aerogena attraverso particelle di saliva e muco, tramite le quali AMPV arriva a contatto con narici, bocca e occhi. Il virus infetta primariamente il tratto superiore dell'apparato respiratorio e solo raramente i polmoni. Dopo la penetrazione nell'apparato respiratorio, AMPV aderisce all'epitelio ciliato dei turbinati nasali e della trachea, per i quali mostra uno notevole tropismo. A seguito dell'adesione alle cellule ciliate, AMPV replica attivamente al loro interno stimolando una risposta infiammatoria locale.

Secondo Jones *et al.* (1988) il virus può infettare l'apparato riproduttore per contiguità con i sacchi aerei, e quindi replicare nell'epitelio dell'ovidutto maturo determinando una diminuzione della funzionalità ovarica.

2.2.5 Segni clinici, morbilità e mortalità

La TRT può presentarsi nei tacchini a qualsiasi età. L'elevata variabilità nelle manifestazioni cliniche dipende da condizioni di management non corrette come il sovraffollamento, la scarsa ventilazione e l'alta umidità ambientale, specialmente nel periodo invernale (Gough e Jones, 2008).

Nei soggetti giovani, i segni clinici sono rappresentati da starnuti, rantoli tracheali, scolo nasale prima sieroso e poi catarrale (per complicazioni batteriche), congiuntivite schiumosa, ingrossamento dei seni infraorbitali ed edema sottomandibolare. Negli animali più adulti si nota frequentemente scuotimento della testa e tosse (Gough e Jones, 2008). Nelle infezioni non complicate, gli animali guariscono in circa due settimane (Cook, 2000a).

Nei riproduttori in deposizione può manifestarsi un calo della produzione di uova con aumento dell'incidenza di peritoniti. Nei tacchini da ingrasso l'anoressia porta ad un calo dell'incremento ponderale (Jones *et al.*, 1986; McDougall e Cook, 1986; Turpin *et al.*, 2002).

La morbilità nei tacchini a tutte le età è prossima al 100% (Stuart, 1989), mentre la mortalità può variare dallo 0,4% fino al 50% (Wyeth, 1990). Quest'ultima può essere influenzata dalla giovane età dei soggetti, dalla cattiva gestione dell'allevamento e da altre infezioni virali o batteriche intercorrenti.

2.2.6 Lesioni anatomico-patologiche

2.2.6.1 Lesioni macroscopiche

Nel tacchino, soprattutto nei soggetti più giovani, si osserva congiuntivite con scolo schiumoso, edema sottomandibolare, rinite, sinusite e tracheite con essudato, dapprima sieroso, limpido, poi catarrale a causa di complicazioni batteriche. L'essudato misto a materiale polverulento può occludere le narici, e i seni infraorbitali appaiono così rigonfiati poiché ripieni di essudato sieroso, catarrale o caseoso (Gough e Jones, 2008).

Nelle infezioni complicate da batteri come *E. coli* si nota un peggioramento delle lesioni sistemiche con polmonite fibrinosa, aerosacculite, pericardite e, raramente, periepatite e splenomegalia (Stuart, 1989).

Nei riproduttori le lesioni economicamente più rilevanti sono a carico dell'apparato riproduttore femminile e consistono in degenerazione ovarica e dell'ovidutto, diminuito numero dei follicoli ovarici e possibile diffusione di tuorlo in addome, con conseguente peritonite da uovo (Jones *et al.*, 1991).

2.2.6.2 Lesioni microscopiche

L'infezione sperimentale di tacchini di 5 settimane di età con il ceppo europeo di AMPV ha provocato la completa perdita di ciglia dell'epitelio tracheale 4 giorni post-infezione (Jones, 1996). Le lesioni istopatologiche sono state studiate in dettaglio grazie ad infezioni sperimentali. Dopo uno o due giorni dall'infezione i turbinati presentano ipertrofia ghiandolare, perdita focale di ciglia vibratili, iperemia e lieve infiltrazione di mononucleati nella sottomucosa. Dopo tre e cinque giorni si osservano lesioni all'epitelio e una copiosa infiltrazione di cellule mononucleate nella mucosa. Queste lesioni si riscontrano anche a livello della mucosa tracheale. (Naylor e Jones, 1993). Il processo di riparazione e di rigenerazione tissutale inizia due settimane post-infezione e la completa *restitutio ad integrum* tissutale avviene dopo 18 giorni (Catelli *et al.*, 1998).

2.2.7 Immunità

2.2.7.1 Immunità cellulo-mediata

L'immunità cellulo-mediata è molto importante per prevenire l'infezione. Infatti, pulcini privati della borsa di Fabrizio, non in grado di produrre anticorpi, e successivamente vaccinati, erano comunque refrattari all'infezione con un ceppo virulento di AMPV (Jones *et al.*, 1992). Chary *et al.* (2002) hanno osservato un'azione immunosoppressiva di AMPV per una diminuzione dell'effetto mitogenico dei linfociti T durante la prima settimana post-infezione.

2.2.7.2 Immunità umorale

L'immunità umorale sistemica non è protettiva in quanto gli anticorpi non arrivano nei siti primari di replicazione del virus, vale a dire turbinati e trachea (Naylor *et al.*, 1997a). Al contrario, l'immunità umorale locale mucosale (immunoglobuline A secretorie, IgA-S) è virus neutralizzante, cioè in grado di prevenire l'infezione (Kehra e Jones, 1999). L'infezione scatena un'elevata infiltrazione e proliferazione linfocitaria nelle prime vie aeree con un'elevata prevalenza di linfociti produttori di IgA-S e IgG nel liquido lacrimale (Cha *et al.*, 2006) e nella trachea (Liman e Rautenschlein, 2007).

2.2.7.3 Immunità passiva

Il titolo materno ha una durata di circa 3 settimane ed è correlato al livello di anticorpi circolanti nella madre (Hafez, 1993). Naylor *et al.* (1997b) hanno dimostrato da tacchinotti di un giorno di vita, con un alto livello di anticorpi materni, non sono protetti dall'infezione. Infatti, a

seguito di infezione sperimentale, gli Autori hanno osservato sintomatologia, anche se più lieve rispetto a quella riscontrata in animali privi di tale immunità.

2.3 Diagnosi

2.3.1 Isolamento e identificazione

Sin dai primi tempi, l'isolamento virale si mostrò estremamente difficoltoso a causa della breve persistenza di AMPV nei tessuti e nei organi, dove raggiunge un titolo virale massimo dopo una settimana post-infezione (Jones, 1996; Cook e Cavanagh, 2002). Inoltre, numerosi insuccessi nell'isolamento del virus sono causati dalla contemporanea presenza di altri microrganismi secondari quali i batteri. La matrice più importante per l'isolamento è l'essudato nasale ed oculare prelevato dai seni infraorbitali e dai turbinati nasali. Da sottolineare il fatto che l'isolamento virale ha successo solo se vengono campionati animali che non manifestano ancora sintomatologia respiratoria o sono nella fase iniziale.

AMPV può essere isolato facilmente in organocolture di anelli tracheali (*Turkey Origin Culture-TOC*) (McDougall e Cook, 1986; Wyeth *et al.*, 1986), in uova embrionate di pollo *Specific Pathogen Free* (SPF) (Buys *et al.*, 1989) e su alcune linee cellulari (VERO e cellule embrionali di pollo) anche se con difficoltà (Gough e Jones, 2008).

2.3.1.1 Isolamento su TOC

Le TOC, preparate da embrioni SPF di pollo o di tacchino o da pulcini di 1-2 giorni provenienti da allevamenti negativi per AMPV, sono il metodo di isolamento più comune per i sottotipi A e B, perchè più sensibili in primo isolamento (Naylor e Jones, 1993) e più economiche rispetto alle uova embrionate.

L'eventuale presenza di AMPV sottotipo A o B è rilevata 6-10 giorni post-inoculazione sulla base della comparsa di stasi ciliare, e il titolo virale è massimo dopo 3-5 giorni (Cook *et al.*, 1991). La ciliostasi rappresenta un criterio più oggettivo di valutazione della replicazione virale rispetto alle lesioni embrionali, tuttavia non è possibile ricorrere a questa tecnica per l'isolamento del sottotipo C, in quanto non causa ciliostasi (Cook *et al.*, 1999).

2.3.1.2 Isolamento su uova embrionate

L'isolamento su uova embrionate è più laborioso e costoso rispetto a quello su TOC. Questa tecnica si avvale di uova embrionate di pollo o tacchino di 6-8 giorni provenienti da allevamenti AMPV negativi. Il virus viene inoculato nel sacco vitellino e, dopo 8 giorni, il liquido allantoideo e la membrana del sacco vitellino vengono prelevati per essere inoculati nuovamente

in uova. Dopo diversi passaggi su uova è necessario prelevare il liquido allantoideo per inocularlo su colture cellulari. Nei campioni positivi si rileva effetto citopatico, presenza di focolai disseminati di cellule rotonde e formazione di sincizi (Buys *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1999).

2.3.1.3 Identificazione virale

Gli effetti osservati sui substrati utilizzati per l'isolamento, come ad esempio la ciliostasi su TOC, sono caratteristici ma non esclusivi di AMPV. Per questo motivo è necessario confermare la presenza del virus e a questo scopo è possibile ricorrere a diverse tecniche:

- microscopio elettronico (Giraud *et al.*, 1987; Buys *et al.*, 1989);
- virus neutralizzazione (Gough e Jones, 2008);
- immunofluorescenza (Jones *et al.*, 1988);
- immunoperossidasi (Catelli *et al.*, 1998);
- pannello di anticorpi monoclonali (Cook *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1993);
- *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), in grado di distinguere i diversi sottotipi sulla base delle differenze genomiche (Juhasz e Easton, 1994; Naylor *et al.*, 1997b; Dani *et al.*, 1999).

2.3.2 Immunofluorescenza e immunoperossidasi

L'immunofluorescenza diretta o indiretta permette di evidenziare la presenza del virus direttamente in tessuti (trachea e turbinati) ed essudati (Baxter-Jones, 1986). Rispetto all'isolamento virale questa tecnica è più rapida e meno laboriosa, anche se la sua validità diagnostica nelle infezioni di campo non è ancora stata provata.

L'immunoperossidasi è anch'essa una metodica di veloce esecuzione (O'Loan *et al.*, 1990), ma appare scarsamente sensibile (Catelli *et al.* 1998).

2.3.3 Tecniche biomolecolari

Recentemente sono stati ottenuti significativi miglioramenti nella diagnosi di AMPV basandosi su tecniche di biologia molecolare. Come per altri patogeni respiratori, anche per AMPV è stata messa a punto la RT-PCR. I primi protocolli di RT-PCR amplificavano una sequenza nucleotidica appartenente al gene della proteina di fusione F (Jing *et al.*, 1993), e successivamente della proteina del nucleocapside N e della proteina G (Bayon-Auboyer *et al.*, 1999). Mediante questa tecnica è stato possibile identificare la presenza di AMPV da tamponi tracheali anche 17-19 giorni post-infezione. Questa tecnica è inoltre in grado di differenziare gli

isolati virali nei sottotipi A e B (Naylor *et al.*, 1997a) e nel sottotipo C (Pedersen *et al.*, 2000). Bayon-Auboyer *et al.* (1999) hanno messo a punto una metodica in grado di amplificare un tratto del gene N e quindi di evidenziare contemporaneamente i sottotipi A, B, C e D.

L'analisi della sequenza del gene G di numerosi ceppi AMPV sottotipo B, isolati in varie aree geografiche del mondo (Cecchinato *et al.*, 2009), ha rivelato la presenza, nella sola sequenza del vaccino B (ceppo VCO3), il più utilizzato in Italia, di un sito di riconoscimento dell'enzima di restrizione *Msel*. Tale sito è localizzato nell'amplicone che si ottiene con il protocollo di RT nested-PCR messo a punto da Naylor *et al.* (1997b) e comunemente impiegato in Europa per la diagnosi di infezioni da AMPV e per la distinzione fra sottotipi A e B. Basandosi su queste evidenze, Lupini *et al.* (2010) hanno messo a punto e testato su alcuni AMPV isolati in Italia, inclusi i ceppi precoci isolati da Catelli *et al.* (2010), un protocollo di *Restriction Fragment Length Polymorfisme* (RFLP) in grado di discriminare fra ceppi di campo sottotipo B e vaccinali. Il protocollo di RFLP si basa su una RT nested-PCR specifica sia per il sottotipo A che per il B ed è altamente sensibile (Cecchinato *et al.*, 2004). Esso aggiunge alla RT nested-PCR la possibilità di discriminare tra ceppi di campo e ceppi vaccinali, qualora venga evidenziata una positività per AMPV sottotipo B. Altri Autori hanno messo a punto metodiche di laboratorio in grado di identificare il ceppo AMPV vaccinale PL21 basandosi, alternativamente, su PCR-RFLP (Cavanagh *et al.*, 1999) o real-time PCR (Bouley *et al.*, 2009) disegnate su un tratto del gene F.

Al fine di interpretare correttamente i risultati di positività alla RT-PCR, è necessario tenere presente che questa tecnica, altamente sensibile, è in grado di rivelare la presenza di anche solo pochissime porzioni di RNA virale, e non del virus vivo in tessuti e organi infetti. Pertanto, il significato diagnostico di un risultato positivo, relativamente alla reale azione patogena di AMPV in quel determinato momento, resta da stabilire ed è da valutare in associazione all'isolamento virale e alla sierologia.

2.3.4 Sierologia

A causa delle difficoltà riscontrate nell'isolamento e nell'identificazione di AMPV, sono state sviluppate tecniche sierologiche per confermare l'avvenuta infezione di campo. Il test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Chettle e Wyeth, 1988; O'Loan *et al.*, 1990) è il più comunemente utilizzato, mentre altre tecniche comprendono la virus neutralizzazione (Baxter-Jones *et al.*, 1989) e l'immunofluorescenza indiretta (Naylor e Jones, 1993; Cook e Cavanagh, 2002).

2.3.4.1 ELISA

In commercio sono presenti numerosi kit ELISA diretta e competitiva in grado di evidenziare anticorpi per AMPV sottotipo A e B, che offrono il vantaggio di essere rapidi e facilmente automatizzabili (Baxter-Jones *et al.*, 1989; Naylor e Jones, 1993). Questa tipologia di test permette di analizzare un'elevata quantità di campioni contemporaneamente, anche se sono state riportate differenze in sensibilità e specificità (Cook, 2000a).

2.3.4.2 Sieroneutralizzazione

A differenza dell'ELISA, questa tecnica identifica anticorpi neutralizzanti AMPV ed è dotata di una sensibilità simile all'ELISA e all'immunofluorescenza (Baxter-Jones *et al.*, 1989; Cook, 2000a), ma è più laboriosa e costosa, quindi poco utilizzata nella routine diagnostica per analizzare numerosi campioni (Jones, 1996).

2.3.4.3 Immunofluorescenza indiretta

Questa tipologia di test è stata descritta da Naylor e Jones (1993) e da Cook e Cavanagh (2002). È un metodo utilizzato principalmente per la ricerca, con pochi risvolti pratici in caso di numerosi campioni provenienti dal campo.

2.4 Strategie di controllo

2.4.1 Eradicazione

Attualmente non è possibile eradicare AMPV da zone endemiche ad alta densità di allevamenti avicoli, come il Nord Italia, e sono pochi i casi riportati di eradicazione di AMPV. In Colorado l'eradicazione ha avuto successo grazie alla contestuale rigida applicazione delle norme di biosicurezza e a buone pratiche di gestione degli allevamenti (Cook, 2000a). Va tuttavia precisato che il Colorado possiede una popolazione avicola ridotta, rispetto ad altre aree come ad esempio il Nord Italia o il Minnesota, altro stato americano.

2.4.2 Vaccinazione

La vaccinazione è l'unico metodo efficace per il controllo delle infezioni da AMPV nelle aree ad elevata vocazione avicola. I programmi vaccinali prevedono l'utilizzo di presidi vivi attenuati nei giovani polli e tacchini e di vaccini inattivati nei riproduttori e nelle galline ovaiole.

2.4.2.1 Vaccini vivi attenuati e vaccini inattivati

I tacchini da carne possono essere vaccinati ad un giorno di vita in incubatoio, o nella prima settimana di vita in allevamento, in quanto gli anticorpi materni, presenti fino alla terza settimana d'età, non interferiscono con la replicazione del virus vaccinale ed il conseguimento della protezione immunitaria (Naylor *et al.*, 1997a).

Questi vaccini sono somministrati via spray o per via oculo-nasale in incubatoio, oppure in acqua da bere in allevamento. I vaccini vivi "mimano" un'infezione di campo stimolando una risposta immunitaria mucosale locale con produzione di IgA-S e la comparsa di linfociti T citotossici antigene-specifici.

Una sola vaccinazione può essere in grado di proteggere i tacchini da carne per tutta la loro vita (Cook, 2000b) anche se, in condizioni di campo, è stato dimostrato che la vaccinazione con AMPV A o B protegge da ceppi omologhi ed eterologhi per un periodo non superiore a 11 settimane.

I programmi vaccinali per le pollastre e i riproduttori prevedono anche l'utilizzo di vaccini inattivati. In questi animali, la profilassi vaccinale prevede l'iniziale somministrazione di un vaccino vivo attenuato seguita dall'impiego di un vaccino spento prima dell'inizio dell'ovodeposizione.

2.4.2.2 Cross-protezione tra sottotipi diversi

Diversi studi condotti per valutare il grado di cross-protezione tra i sottotipi A e B (Cook *et al.*, 1989) hanno rilevato l'esistenza di una buona protezione crociata tra i due sottotipi (Cook *et al.*, 1995; Etteradossi *et al.*, 1995; Toquin *et al.*, 1996). Inoltre, i ceppi vaccinali A e B sono in grado di proteggere nei confronti del sottotipo C e del ceppo D (non-A/non-B) isolato in Francia (Toquin *et al.*, 1999).

2.4.2.3 Reversione a virulenza di ceppi vaccinali

AMPV è un virus a RNA geneticamente instabile ed è possibile che i ceppi virali attenuati vadano incontro, nel tempo, ad una reversione a virulenza (Gough e Jones, 2008). Naylor *et al.* (2002) hanno evidenziato che, dopo molteplici passaggi seriali di un vaccino vivo in condizioni sperimentali, il virus riacquistava capacità patogene e il suo genoma riprendeva le caratteristiche del progenitore. Catelli *et al.* (2006) hanno dimostrato che un vaccino sottotipo A è revertito a virulenza in tacchini di 18 giorni e questo virus, in condizioni sperimentali, ha riprodotto sintomi clinici riferibili a TRT. Ricchizzi *et al.* (2008) hanno confermato anche recentemente questo evento in tacchini di 7 settimane.

2.4.2.4 Vaccini ricombinanti

Naylor *et al.* (2004) hanno messo a punto un sistema di *reverse genetics* in grado di modificare il patrimonio genetico AMPV con mutazioni in punti specifici, o eseguendo delezioni o inserzioni di interi geni, al fine di ottenere cloni infettivi modificati geneticamente. Tale sistema permetterà la produzione di una nuova generazione di vaccini vivi più stabili ed efficaci di quelli attualmente disponibili.

Capitolo 3

Enterite emorragica del tacchino

L'enterite emorragica è una malattia virale acuta che colpisce i tacchini a partire dalla quarta settimana di vita. La patologia è caratterizzata da depressione, morte improvvisa e feci sanguinolente. Fu segnalata per la prima volta da Pomeroy e Fenstermacher (1937) in Minnesota e oggi è diffusa in tutto il mondo. L'importanza economica di questa malattia è dovuta alla mortalità da essa provocata, che può raggiungere anche il 60%, e da immunodepressione transitoria che può favorire l'insorgenza di altre patologie quali la coccidiosi, l'enterite necrotica da *Clostridium perfringens* e, soprattutto, la colibacillosi.

3.1 Eziologia

3.1.1 Classificazione e tipizzazione

Studi morfologici, istologici ed immunologici indicano che il virus dell'enterite emorragica (*hemorrhagic enteritis virus* - HEV) è un membro della famiglia *Adenoviridae*. Attualmente, attraverso studi sul DNA virale, è stato deciso di incorporare HEV nel genere *Siadenovirus* e chiamarlo Adenovirus A del tacchino (Pierson e Fitzgerald, 2008). Il genoma di HEV è di circa 26,6 bp. Le proteine strutturali maggiori sono l'esone e il *penton fiber*. L'esone è la maggiore proteina del capsido del virione icosaedrico e su di esso sono localizzati i determinanti gruppo e sottogruppo-specifici.

Benchè siano state segnalate differenze antigeniche sulla base di affinità ad anticorpi monoclonali (van den Hurk, 1988), i ceppi sono considerati sierologicamente indistinguibili e sono cross-protettivi (Domermuth *et al.*, 1977). Una comparazione tra genomi di ceppi HEV virulenti e non virulenti ha rilevato una loro omologia del 99,9%. Tuttavia, la comparsa di mutazioni nel *penton fiber* e in *opening reading frame 1* (ORF1) e/o nei geni E3 potrebbe comportare variazioni nella virulenza (Beach, 2006).

3.1.2 Morfologia

Preparazioni di tessuto esaminate al microscopio elettronico rivelano che le particelle virali sono icosaedri privi di *envelope* con un totale di 252 capsomeri. I virioni hanno un diametro

compreso tra 60 e 90 nm e le differenze di forma sono probabilmente comprese all'interno dell'errore sperimentale (Pierson e Fitzgerald, 2008).

3.1.3 Composizione chimica

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide e il *western blotting* hanno dimostrato che HEV ha almeno 11 polipeptidi strutturali distinti, con pesi molecolari compresi tra 14 e 97 kD e 9,5 e 96 kD (Pierson e Fitzgerald, 2008).

3.1.4 Sensibilità ad agenti chimici e fisici

Il potere infettante di HEV può essere eliminato con il calore a 70 °C per 1 ora, con l'essiccamento a 37 °C o 25 °C per una settimana (Domermuth e Gross, 1971) e con trattamento con ipoclorito di sodio allo 0,0086% (Domermuth e Gross, 1972). Il virus è stabile anche a basso pH (Domermuth e Gross, 1984).

3.2 Patobiologia ed epidemiologia

3.2.1 Incidenza e distribuzione geografica

L'enterite emorragica è una malattia che crea gravi problemi sanitari da almeno quarant'anni a questa parte negli Stati Uniti, ed attualmente è segnalata in tutto il mondo (Domermuth e Gross., 1984). Indagini sierologiche indicano che HEV è ampiamente presente negli allevamenti di tacchini adulti (Pierson e Domermuth, 1997). L'infezione da HEV è molto comune anche nei tacchini da carne negli allevamenti italiani, come segnalato da Vinco *et al.* (2008) sulla base di osservazioni di campo. Questi Autori hanno rilevato che HEV è causa di bassa mortalità che tuttavia, se complicata da forme batteriche secondarie, può andare dall'1% fino al 7-8%. Tramite un'ampia indagine sierologica, gli stessi Autori hanno osservato che, nella maggior parte degli 86 allevamenti di tacchini da carne testati, gli animali mostravano un rialzo anticorpale per HEV intorno alle 10 settimane. In questo studio non era stata eseguita nessuna correlazione epidemiologica con eventuali episodi di mortalità da colibacillosi.

3.2.2 Ospiti naturali e sperimentali

I tacchini, i fagiani e i polli sono stati sempre considerati i soli ospiti naturali di HEV. Tuttavia, recentemente, alcune segnalazioni scientifiche hanno ipotizzato che faraone (Cowen *et al.*, 1988; Massi *et al.*, 1995) e pappagalli possano infettarsi in condizioni naturali. Infezioni di

laboratorio indicano che HEV isolato da tacchini, è in grado di infettare i fagiani (Domermuth *et al.*, 1979) e che HEV isolato da polli, può infettare i tacchini (Domermuth *et al.*, 1982).

A causa degli anticorpi materni, l'enterite emorragica nel tacchino non è comunemente osservata prima delle 6 settimane di età e il maggior numero di casi viene rilevato tra le 6 e le 11 settimane (Pomeroy e Fenstermacher, 1937).

3.2.3 Modalità di trasmissione

HEV si può trasmettere a tacchinotti suscettibili tramite feci infette sia per via orale che cloacale (Gross e Moore, 1967; Itakura *et al.*, 1974). Il virus può rimanere vitale per molte settimane in carcasse protette dall'essiccamento ed in materiale fecale umido. HEV può essere presente nella lettiera contaminata e la malattia, tipicamente, riappare in allevamenti dove è già stata presente (Domermuth e Gross, 1984). Non esiste evidenza epidemiologica di trasmissione attraverso le uova o attraverso veri vettori biologici (Domermuth e Gross, 1984).

3.2.4 Patogenesi

HEV è considerato un virus linfotropico e linfocitopatico avente come bersaglio primario i linfociti B con recettori IgM (Suresh e Sharma, 1996; Rautenschlein *et al.*, 1998). Anche i macrofagi sono un sito di replicazione (van den Hurk, 1990; Suresh e Sharma, 1995); è noto, infatti, come la bursectomia riduca la replicazione virale e la formazione delle lesioni.

Sono state formulate numerose ipotesi circa il meccanismo di immunopatogenesi di HEV. Tra queste, il modello composito elaborato da Rautenschlein e Sharma (2000) è la teoria più recente e più accreditata. Dopo infezione, il virus raggiunge livelli massimi di replicazione nei linfociti B nell'intestino e nella borsa di Fabrizio e arriva direttamente alla milza attraverso il circolo sanguigno. In questo organo HEV infetta ulteriori linfociti B e i macrofagi replicando in elevata quantità. Questa replicazione massiva favorisce l'arrivo di linfociti T CD4 e di macrofagi nella polpa bianca splenica, verosimilmente per eliminare il virus, causando iperplasia della stessa e il tipico aspetto macroscopico di milza marmorizzata. Una volta attivati, i macrofagi producono diverse interleuchine, tra le quali IL-6 e il fattore di necrosi tumorale (*Tumoral Necrosis Factor-TNF*), che inducono i linfociti T a produrre più interferoni (IFN) e il TNF. L'interferone tipo II attiva la popolazione macrofagica, stimolando la produzione di ossido nitrico, che ha proprietà antivirali e immunodepressive. L'interferone tipo I viene prodotto invece per limitare la replicazione virale (Rautenschlein *et al.*, 2000). Nell'evoluzione del processo infettivo, la replicazione di HEV induce apoptosi e necrosi delle cellule bersaglio con conseguente deplezione dei linfociti B con recettori IgM. Le citochine rilasciate dalle cellule T attivate e i macrofagi possono indurre apoptosi delle cellule *by-stander*. Il risultato finale è un

massivo evento apoptotico accompagnato da un periodo transitorio di immunodepressione. È stato anche ipotizzato che il rilascio di elevate quantità di citochine dia inizio allo shock sistemico e promuova lo sviluppo delle caratteristiche lesioni vascolari del tratto gastrointestinale, organo primario di risposta allo shock nel tacchino.

Presumibilmente, HEV da solo in è grado di predisporre i tacchini ad infezioni secondarie da *E. coli* in campo (Pierson *et al.*, 1996a).

3.2.5 Segni clinici, morbilità e mortalità

L'enterite emorragica è caratterizzata da una rapida progressione della sintomatologia in 24 ore. I sintomi includono depressione, feci con sangue e mortalità. Le feci emorragiche aderiscono frequentemente al piumaggio e circondano la cloaca degli animali moribondi o morti. In allevamento i segni di malattia si risolvono dopo 6-10 giorni dalla comparsa delle feci emorragiche.

Attualmente negli allevamenti italiani l'enterite emorragica presenta di rado l'aspetto di un'emorragia intestinale. Tipicamente i gruppi di tacchini, a seguito di infezione, presentano fenomeni di mortalità riferibili a colibacillosi tra le 7 e le 10 settimane di età.

3.2.6 Lesioni anatomopatologiche

3.2.6.1 Macroscopiche

I tacchini morti normalmente appaiono anemici a causa della perdita di sangue, ma spesso sono in buone condizioni di nutrizione e con mangime nel gozzo. Il piccolo intestino è di norma disteso con contenuto emorragico. La mucosa intestinale è congesta e, in alcuni soggetti, ricoperta da una membrana fibrino-necrotica. Le lesioni sono solitamente più marcate nel tratto prossimale del piccolo intestino (ansa duodenale) ma possono estendersi anche distalmente nei casi più gravi. Le milze dei soggetti infetti sono aumentate di volume, friabili e con aspetto marmorizzato, mentre quelle dei tacchinotti morti possono essere più piccole per perdita di sangue e conseguente contrazione (Pierson e Fitzgerald, 2008).

3.2.6.2 Microscopiche

Le lesioni istologiche sono maggiormente evidenti a carico degli organi linfoidei e dell'apparato gastrointestinale.

Le lesioni spleniche negli animali morti comprendono l'iperplasia della polpa bianca e la necrosi linfoide. Nelle cellule mononucleate, come macrofagi e linfociti, sono presenti corpi inclusi intranucleari (Meteyer *et al.*, 1992; Saunders *et al.*, 1993; Suresh e Sharma, 1996).

Lesioni tipiche del tratto gastrointestinale comprendono grave congestione della mucosa intestinale, degenerazione e perdita dei villi intestinali con emorragia all'apice degli stessi. Le emorragie sono causate da una disgregazione dell'endotelio più che da una sua distruzione, infatti i vasi sanguigni della lamina propria sono intatti e i globuli rossi fuoriescono da questi per diapedesi (Saunders *et al.*, 1993). Si osservano numerose cellule mononucleate con inclusioni intranucleari nella lamina propria (Hussain *et al.*, 1993), insieme a mastociti (Opengart *et al.*, 1992), plasmacellule ed eterofili (Saunders *et al.*, 1993). Queste lesioni istopatologiche sono più marcate a livello duodenale distalmente allo sbocco dei dotti pancreatici, ma lesioni simili e lievi possono presentarsi nel proventriglio, nel ventriglio, nella parte posteriore del piccolo intestino, nei ciechi, nelle tonsille ciecali e nella borsa di Fabrizio (Domermuth e Gross, 1984).

3.2.7 Immunità

3.2.7.1 Attiva

Gli anticorpi per HEV vengono rilevati già 3 giorni dopo l'infezione tramite ELISA (van den Hurk, 1986). Questa immunità umorale è protettiva e di lunga durata, anche se non persiste per tutta la vita dell'animale. L'immunità cellulo-mediata senza dubbio gioca un ruolo nella protezione contro l'infezione e nella formazione delle lesioni, benché le sue modalità d'azione non siano ancora completamente note. L'inoculazione di tacchini con HEV causa un aumento di linfociti T CD4 già 4-6 giorni post-infezione (Suresh e Sharma, 1995; Rautenschlein e Sharma, 2000) e dei linfociti T CD8 citotossici dopo 8-10 giorni dall'infezione (Pierson *et al.*, 1993).

3.2.7.2 Passiva

L'immunità materna può conferire protezione dalla forma clinica di malattia fino a 6 settimane dopo la schiusa ed interferire con la vaccinazione fino a 5 settimane (Fadly e Nazerian, 1989). Tuttavia, in condizioni di campo, tipicamente dopo 4 settimane questa immunità decade a sufficienza per permettere la vaccinazione con un presidio vivo preparato da milze infette.

3.3 Diagnosi

3.3.1 Isolamento ed identificazione con tecniche classiche

Elevate quantità di virus possono essere presenti nel contenuto emorragico intestinale e nella milza degli animali moribondi o morti (Gross e Moore, 1967). L'isolamento di HEV è possibile

su coltura cellulare MDTC-RP19 inoculandola con matrice filtrata (0,22 μm) di materiale splenico.

L'identificazione del virus è eseguita con la tecnica di Agar Gel Immunodiffusione (AGID), mediante la quale omogenato di milza (fresco o congelato), diluito 1:1 v/v con PBS, viene fatto precipitare con siero policlonale anti HEV (Domermuth *et al.*, 1972 e 1973; Pierson *et al.*, 1998).

L'antigene virale può anche essere rilevato in sezioni di organo congelate (4-6 μm) o poste in formalina utilizzando l'immunofluorescenza (Fasina e Fabricant, 1982) o l'immunoperossidasi (Fitzgerald *et al.*, 1992).

Metodi meno comunemente impiegati per evidenziare la presenza dell'antigene virale sono l'ELISA a cattura dell'antigene (Ianconescu *et al.*, 1984) e l'ibridazione *in situ* (Suresh e Sharma, 1996).

3.3.2 PCR

Recentemente sono state implementate tecniche di biologia molecolare come la PCR convenzionale (Beach, 2006), la nested-PCR e la real-time PCR (Beach, 2006) per l'identificazione del DNA virale in tessuti freschi o congelati.

3.3.3 Sierologia

3.3.3.1 Agar Gel Immunodiffusione (AGID)

Mediante questa metodica, gli anticorpi verso HEV possono essere rilevati nel plasma o nel siero di animali 2-3 settimane post-infezione (Domermuth *et al.*, 1972 e 1973). Se la diagnosi si basa solo sulla sierologia, è consigliabile analizzare contemporaneamente sieri acuti e convalescenti. È possibile evidenziare anche gli anticorpi materni, anche se la sensibilità dell'AGID è scarsa in animali di età superiore a una settimana (van den Hurk, 1986).

3.3.3.2 ELISA

Recentemente sono state sviluppate tecniche ELISA molto più sensibili rispetto all'AGID (Ianconescu *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1985). Esse sono in grado di rilevare anticorpi materni nei tacchini fino a 4-6 settimane, sebbene molti soggetti in campo siano già sieronegativi a 3 settimane di età (van den Hurk, 1986). Inoltre, i test ELISA sono in grado di evidenziare anticorpi precocemente, a partire da 3 giorni post-infezione (van den Hurk, 1986).

3.4 Strategie di controllo

3.4.1 Vaccinazione

In Italia, per la vaccinazione di tacchini da carne e riproduttori, è disponibile solamente un vaccino inattivato contenente HEV ceppo Domermuth con titolo non inferiore a 1 U AGP. Il vaccino viene somministrato per via sottocutanea nella parte dorsale del collo (terzo inferiore) inoculando 0,25 ml/capo. La prima vaccinazione viene effettuata a 3-4 settimane di età e la seconda a 7-8 settimane.

Nel mondo sono autorizzati vaccini vivi ottenuti con ceppi avirulenti di HEV (Domermuth *et al.*, 1977). Attualmente nel tacchino vengono impiegate due tipologie di vaccini vivi. La prima è ricavata da omogenato di milze di tacchini di 6 settimane infettati per via orale o endovenosa con il ceppo Domermuth. L'altra tipologia è prodotta *in vitro* propagando il virus su colture cellulari MDTC-RP19 (Fadly *et al.*, 1985). Entrambi i vaccini sono in grado di produrre adeguata sierconversione e protezione (Barbour *et al.*, 1993) e vengono utilizzati comunemente negli Stati Uniti.

La somministrazione dei vaccini vivi avviene attraverso l'acqua di bevanda tra le 3 e le 6 settimane di vita dei tacchini. Allevamenti che non raggiungono una protezione del 100% dopo questa vaccinazione sono di solito protetti per trasmissione laterale in 2-3 settimane. In alcuni casi è consigliabile rivaccinare i tacchini una settimana dopo il primo intervento (Chary *et al.* 2002).

Capitolo 4

Colibacillosi da *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC)

La colibacillosi può essere causata solo da ceppi specifici di *Escherichia coli* chiamati APEC, portatori di geni di virulenza. Si tratta di un'infezione sistemica o localizzata della quale si riconoscono numerose manifestazioni patologiche quali: colisetticemia, coligranuloma (malattia di Hjarrè), aerosacculite, malattia della testa gonfia, cellulite fibrinosa, peritonite, salpingite, osteomielite, sinovite ed onfalite con infezione del sacco vitellino (Barnes *et al.*, 2008). Questa malattia si manifesta a tutte le età nel pollame allevato industrialmente, con un tasso di prevalenza maggiore nelle galline ovaiole adulte, nel tacchino, nel pollo e nelle anatre (Lutful Kabir, 2010).

4.1 Eziologia

4.1.1 Classificazione

L'agente eziologico della colibacillosi è *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Altri agenti infettivi quali virus, micoplasmi e fattori non infettivi ambientali come l'ammoniaca possono predisporre all'infezione nelle specie avicole e contribuire alla gravità della malattia (Barnes *et al.*, 2008).

Escherichia è il genere tipo della famiglia delle *Enterobacteriaceae* che è composta da microrganismi che possono crescere in condizioni di aerobiosi ed anaerobiosi ed utilizzare fonti di carbonio e di azoto (Bettelheim, 1994). *E. coli* è la specie tipo del genere *Escherichia* ed è la più comune e più patogena.

E. coli fu inizialmente nominato *Bacterium (Bacillus) coli commune*. Questa denominazione fu abbreviata a *Bacterium coli* prima del suo nome attuale stabilito nel 1919 (Ewing, 1986). Il nome di questo genere è stato coniato in onore del suo scopritore Theobald von Escherich, un pediatra, che per primo lo identificò nel 1885 nelle feci di bambini (Bopp *et al.*, 2003).

Escherichia fergusonii, specie correlata ad *E. coli*, è stata isolata dai tacchini (Farmer *et al.*, 1985). Questo batterio ha causato mortalità acuta in struzzi adulti dopo un breve periodo di anoressia, depressione e grave enterite emorragica (Herraez *et al.*, 2005).

4.1.2 Morfologia e colorazione

E. coli è un bacillo Gram negativo, privo di spore, con dimensioni di circa 2-3 x 0,6 µm. Gli organismi che crescono in coltura sono di dimensioni e forma molto variabili e quelli presenti all'interno delle cellule sono spesso più piccoli di quelli in sede extracellulare. La maggior parte dei ceppi è mobile ed ha flagelli peritrichi (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.3 Condizioni di crescita

E. coli cresce in aerobiosi ed anaerobiosi sui comuni terreni nutritivi a temperature comprese tra 18 e 44 °C (Barnes *et al.*, 2008). È in grado di fermentare molti carboidrati producendo gas (vedi paragrafo 4.1.5).

4.1.4 Crescita su terreni di coltura

Sulle piastre di agar sangue incubate per 24 ore a 37 °C, le colonie appaiono basse, convesse, lisce e di colore bianco-grigiastro e raramente possono sviluppare emolisi. Sebbene le dimensioni delle colonie possano variare, generalmente esse sono di 1-3 mm di diametro. Possono essere osservate sia colonie più larghe con aspetto rugoso e margini irregolari, sia colonie mucoidi fortemente convesse, umide e appiccicose. Le colonie batteriche sui terreni selettivi e differenziali hanno colore verde metallico su Eosin-Methylene Blue (EMB-Levine) agar, rosa pallido su MacConkey agar e giallo su Tergitol agar (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.5 Proprietà biochimiche

E. coli è in grado di produrre acido e gas dalla fermentazione di glucosio, maltosio, mannitolo, xilosio, glicerolo, ramnosio, sorbitolo, e arabinosio ma non di destrina, amido e inositolo. La maggior parte dei ceppi fermenta il lattosio, anche se occasionalmente vengono isolati *E. coli* lattosio negativi che vanno differenziati da *Salmonella* spp. La fermentazione di adonitolo, saccarosio, salicina, raffiniosio e dulcitololo è variabile. Gli isolati che fermentano il raffiniosio e il sorbosio causano elevata mortalità nella prova di letalità embrionale (Montgomery *et al.*, 1999).

E. coli produce indolo, ha reazione del rosso metile positiva e riduce i nitrati a nitriti. Le reazioni di ossidasi e di Voges-Proskauer sono negative, come pure la produzione di idrogeno solforato su Triple Sugar Iron (TSI) e Kligler agar. Questo batterio non è in grado di idrolizzare l'urea, liquefare la gelatina o crescere sul terreno citrato agar. Per differenziare *E. coli* da altre specie del genere *Escherichia* (Bettelheim, 1994) e da batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986) possono essere utilizzati anche test biochimici miniaturizzati.

4.1.6 Sensibilità ad agenti chimici e fisici

E. coli non possiede resistenze particolari ad agenti chimici e fisici rispetto ad altri batteri Gram negativi. L'inattivazione della maggior parte dei ceppi è raggiunta con temperature che variano da 60 °C per 30 minuti fino a 70 °C per 2 minuti. Questo microrganismo sopravvive al congelamento e persiste per lunghi periodi a temperature di refrigerazione. L'inattivazione termica della lettiera permette una riduzione del 90% della carica batterica (Himathongkaham *et al.*, 2000).

La moltiplicazione di molti ceppi è inibita a pH inferiore a 4,5 e superiore a 9. Gli acidi organici sono più efficaci di quelli inorganici nella inibizione della crescita di *E. coli*. Il trattamento con acido citrico, tartarico o salicilico riduce in modo significativo la carica di coliformi nella lettiera (Ivanov, 2001).

4.1.7 Struttura antigene

I sierotipi di *E. coli* sono classificati con lo schema di Kauffmann (Ewing, 1986). Attualmente sono conosciuti circa 180 antigeni somatici O, 60 antigeni flagellari H e 80 antigeni capsulari K (Stenutz *et al.*, 2006). Nella maggior parte degli schemi di tipizzazione i ceppi di *E. coli* sono identificati solo con gli antigeni O e H, es. O157:H7. Gli antigeni O determinano il sierogruppo mentre quelli H il sierotipo. Ceppi definiti rugosi non sono tipizzabili in quanti auto-agglutinanti. Gli antigeni fimbriali (pili) vengono inclusi nella tipizzazione solo quando sono considerati importanti, come per esempio F4 e F5 (K88 e K99), presenti nei ceppi di suino e bovino (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.7.1 Antigeni Somatici (O)

La parete esterna è formata da un lipopolisaccaride (LPS), rilasciato quando la cellula viene lisata, che è formato dall'antigene O (porzione antigenica) e dal lipide A (endotossina) (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.7.2 Antigeni Flagellari (H)

Gli antigeni H sono proteine che compongono i flagelli. Per esaminare questi antigeni è necessario fare sviluppare *E. coli* in terreni liquidi. A differenza degli antigeni O, questi antigeni sono termolabili (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.7.3 Antigeni Capsulari (K)

Gli antigeni K sono polimeri acidi contenenti il 2% di zuccheri riducenti. Essi sono associati a virulenza e si presentano sulla superficie della cellula batterica impedendo l'identificazione degli antigeni somatici O (si eliminano perciò con il riscaldamento per 1 ora a 100 °C) (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.7.4 Antigeni F (Pili)

Gli antigeni F sono coinvolti nella fase di adesione alle cellule. Essi sono espressi in modo variabile a seconda dell'ambiente di crescita *in vitro* o *in vivo*. I pili sono classificati come mannosio sensibili o mannosio resistenti (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.8 Tipizzazione

4.1.8.1 Sierotipo

Numerosi studi epidemiologici hanno segnalato i sierotipi maggiormente implicati nella colibacillosi nelle specie avicole (Sharada *et al.*, 2001; Rosario *et al.*, 2004; Thangapandian *et al.*, 2006). Esistono differenze a seconda della zona geografica e, nella maggior parte delle aree, i sierotipi più comuni sono O1, O2, O35, O36 e O78 (Heller e Drabkin, 1977). Altri sierotipi sono stati identificati meno frequentemente ed alcuni *E. coli* non sono tipizzabili (Zhao *et al.*, 2005). Alcuni focolai di colibacillosi sono stati costantemente associati al sierotipo O111 che causava mortalità, setticemia e polisierosite in galline ovaiole (Zanella *et al.*, 2000).

In uno studio, 62 diversi sierogruppi somatici sono stati identificati in 458 ceppi isolati da polli con colibacillosi e in 167 ceppi isolati da animali sani. Solo il 15% dei ceppi apparteneva ai sierogruppi O1, O2, O35, O36 e O78. Numerosi isolati da animali ammalati appartenevano a 5 sierogruppi (O18, O81, O115, O116, O132) che non erano mai stati precedentemente associati a casi di colibacillosi (Blanco *et al.*, 1998).

4.1.8.2 Resistotipo

La determinazione del profilo fenotipico e genetico di antibiotico-resistenza costituisce un'ulteriore tipizzazione di *E. coli*.

Nonostante l'indubbia utilità degli antibiotici nel controllo della colibacillosi e di altre forme batteriche, negli anni si è presa coscienza dei limiti che la terapia farmacologica può presentare a causa della progressiva selezione di batteri antibiotico-resistenti. Infatti, oltre ad una resistenza naturale che i batteri possono presentare per una o più classi di farmaci, grazie alle loro caratteristiche intrinseche, nelle popolazioni batteriche stanno sempre più diffondendo resistenze

di tipo acquisito mediante trasferimento genetico orizzontale da parte di plasmidi, trasposoni e integroni, oppure mediante mutazioni genetiche trasferibili solo verticalmente (Gyles, 2008).

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, in particolare delle strutture geniche coinvolte nella trasmissione orizzontale tra specie batteriche di geni di resistenza agli antibiotici (Carattoli, 2001 e 2003).

È di notevole preoccupazione in Europa la resistenza di *E. coli* aviari ai fluorochinoloni, farmaci non più utilizzati nel pollame negli Stati Uniti (Gyles, 2008). In uno studio molto interessante Petersen *et al.* (2006) hanno descritto la trasmissione verticale di un ceppo APEC O45, resistente a questa classe di farmaci, da polli riproduttori alla progenie. Le basi molecolari della resistenza ai fluorochinoloni consistono principalmente nella presenza di mutazioni puntiformi nei geni cromosomici *gyrA* e *parC* (Yang *et al.*, 2004).

4.1.8.3 Genotipo

È possibile classificare i ceppi di *E. coli* determinando il loro profilo genetico con diverse tecniche di biologia molecolare in grado di originare il *fingerprinting* degli isolati. Tra i metodi più utilizzati per studi epidemiologici vi sono:

- *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE);
- *amplified fragment length polymorphism* (AFLP);
- *restriction fragment length polymorphism* (RFLP);
- *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD).

La PFGE è considerata la tecnica più affidabile per differenziare i microrganismi, ma l'RFLP è utilizzato più di frequente. Entrambe queste metodologie sono dispendiose in termini di tempo e richiedono apparecchiature costose (Lutful Kabir, 2010).

La RAPD è stata proposta come alternativa ed utilizzata per caratterizzare *E. coli* di origine aviare. Questa tecnica è veloce ed è utile per identificare diversi cloni in studi epidemiologici (Johnson J.R. *et al.*, 2006; Maurer *et al.*, 1998a); di fatto è una PCR in cui i segmenti di DNA sono amplificati in modo casuale. I *primer* utilizzati sono corti (8-12 nucleotidi) e si appaiono in posizione casuale nel genoma di batterico con conseguente amplificazione. Grazie a questa tecnica è possibile individuare similarità genomica tra i ceppi isolati e includerli in diversi *cluster* ad elevata omologia (Maurer *et al.*, 1998a; Chansiripornchai *et al.*, 2001)

Tra le nuove tecniche, la *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) è in grado di identificare specifici genotipi ed ha dimostrato che relativamente pochi cloni sono responsabili delle differenti forme di colibacillosi nei polli e nei tacchini in una vasta area geografica (White *et al.*, 1993).

4.1.8.4 Patotipo

Lo studio approfondito di ceppi di *E. coli* isolati da visceri di animali morti di colibacilloso, ha dimostrato che questi sono dotati di potere patogeno per la presenza di uno o più fattori di virulenza (patotipo-potenziale di patogenicità). Questi ceppi sono stati definiti *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) (Janben *et al.*, 2001)

Gli APEC, come altri *E. coli* patogeni presenti in diverse specie animali, possono acquisire geni di virulenza così da distinguersi dai ceppi AFEC (*Avian Fecal E. coli*) che sono batteri commensali della flora microbica intestinale, pressoché privi di patogenicità, non in grado dare luogo a diffusione sistemica nell'animale.

Di seguito sono descritti i più importanti fattori di virulenza dei ceppi APEC.

4.1.8.4.1 Fimbrie tipo 1

Le fimbrie tipo 1 (mannosio sensibili), presenti nel 70-100% degli APEC, permettono a questi ceppi di aderire all'epitelio dell'apparato respiratorio superiore. Le attività adesive di queste fimbrie sono inibite da antisieri specifici e dal D-mannosio che è il recettore cellulare di *E. coli* sulle membrane delle cellule eucariotiche (Wooley *et al.*, 1998). Gli stessi Autori suggeriscono che, sebbene le fimbrie tipo 1 siano necessarie per la colonizzazione iniziale dell'epitelio respiratorio, altri fattori, come la mobilità e la produzione di colicina V (Col V), sono responsabili di lesioni tracheali. È stato ipotizzato che mentre le fimbrie tipo 1 sono associate alla colonizzazione iniziale dell'apparato respiratorio, quelle tipo P sono coinvolte nell'adesione ai visceri interni (Pourbakhsh *et al.*, 1997a).

4.1.8.4.2 Fimbrie tipo P

Queste fimbrie sono codificate dall'operone *pap* localizzato nel cromosoma batterico (Lathman e Stamm, 1994). Il gene *papA* codifica per la proteina strutturale maggiore (PapA). I geni *papD*, *papH*, *papJ*, *papF* e *papK* sono responsabili dell'espressione di proteine strutturali del complesso fimbriale. I geni *papI* e *papB* regolano la variazione di fase del processo, *papE* codifica per l'estremità strutturale della fimbrie e *papG* per la sua adesina (Mol e Oudega, 1996). *PapC* è un gene che codifica per un polipeptide esterno di membrana che dirige il passaggio delle proteine e quindi la costruzione della fimbria. Le proprietà adesive delle fimbrie P sono conferite dall'adesina terminale PapG presente in tre varianti molecolari (I, II e III) (Hoschützky *et al.*, 1989).

Il ruolo delle fimbrie P nella patogenicità degli APEC non è stato ancora completamente delucidato. Da studi *in vivo*, è stato osservato che esse non sono coinvolte nella colonizzazione iniziale del tratto respiratorio, bensì in fasi più tardive dell'infezione (Pourbakhsh *et al.*, 1997a).

È stato dimostrato che l'operone *pap* può essere presente all'interno di un'isola di patogenicità di un ceppo patogeno di *E. coli* chiamato APEC-O1 (Kariyawasam *et al.*, 2006). Gli Autori suggeriscono che questo operone potrebbe essere coinvolto nella trasformazione di ceppi non virulenti a patogeni.

4.1.8.4.3 Resistenza al siero

La presenza di sistemi di resistenza nei confronti dell'attività battericida del siero è considerata un importante fattore di virulenza nei ceppi APEC. I geni coinvolti, denominati *traT* e *iss*, sono localizzati nel plasmide Col V (Johnson *et al.*, 2002, Mellata *et al.*, 2003). È stato ipotizzato che la presenza del fattore *Iss* (*increased serum survival*) negli APEC sia associata alla loro patogenicità (Pfaff-McDonough *et al.*, 2000). La resistenza batterica al complemento, mediata da strutture superficiali batteriche, come LPS e la capsula, è stata osservata in ceppi APEC (Fantinatti *et al.*, 1994, Ngeleka *et al.*, 1996).

4.1.8.4.4 Sistemi di acquisizione del ferro

I ceppi APEC possono sopravvivere e moltiplicarsi nell'ambiente e nell'organismo anche in condizioni di bassa disponibilità di ferro (Dho e Lafont, 1984). L'acquisizione di questo microelemento da parte di *E. coli* avviene attraverso la produzione di siderofori che agiscono come chelanti ionici (Williams *et al.*, 1992). Sono noti due tipi di siderofori: i fenolati e gli idrossammati. L'aerobactina è un sideroforo idrossammato codificato da un operone situato nei plasmidi (Gibson e Magrath, 1969). Diversi Autori hanno dimostrato che solo ceppi APEC esprimono sistemi di acquisizione del ferro, a differenza di *E. coli* non patogeni (Dozois *et al.*, 1992; Emery *et al.*, 1992; Silveira *et al.*, 2002). È stata osservata anche una relazione positiva tra le basse concentrazioni di ferro e la capacità degli APEC di moltiplicarsi e uccidere pulcini di un giorno di vita (Dho *et al.*, 1984). Okeke *et al.* (2004) hanno mostrato in ceppi APEC un'elevata frequenza di geni promotori l'acquisizione del ferro come *iucA* e *iucD*.

Il sistema yersiniabactina, rappresentato dai geni *fyuA* e *irp-2*, è stato identificato con alta prevalenza nei ceppi APEC (Gophna *et al.*, 2001; JanBen *et al.*, 2001).

I sistemi di acquisizione del ferro possono essere codificati da geni presenti in plasmidi (Johnson T.J. *et al.*, 2006) o all'interno di isole di patogenicità cromosomiche (Kariyawasam *et al.*, 2006). La perdita di plasmidi riduce la virulenza e la resistenza agli effetti battericidi del siero e provoca la mancanza del sistema di acquisizione del ferro. La reintroduzione sperimentale dei plasmidi ha determinato il recupero di tali caratteristiche patogene (Ike *et al.*, 1992).

4.1.8.4.5 Agglutinina Termosensibile (*Thermo sensitive haemoagglutin* – TSH)

TSH è una proteina codificata dal gene *tsh* (Provence e Curtiss, 1994) che è localizzato in plasmidi ad alto peso molecolare (Dozois *et al.*, 2000; Stehling *et al.*, 2003; Johnson T.J. *et al.*, 2006) e principalmente nei plasmidi Col V. Questa proteina presenta attività emoagglutinante gli eritrociti di pollo (Provence e Curtiss, 1994).

La presenza del gene *tsh* è stata osservata nel 25% e nel 50% degli APEC isolati rispettivamente da polli con lesioni di setticemia e da soggetti con Sindrome della testa gonfia, e solo nel 6% di *E. coli* commensali (Campos *et al.*, 2005). Maurer *et al.* (1998b) hanno identificato questo gene nel 46% di ceppi APEC e in nessun *E. coli* apatogeno. Ewers *et al.* (2004) hanno proposto l'utilizzazione del gene *tsh* come *marker* molecolare per evidenziare ceppi APEC.

4.1.8.4.6 Colicine

Le colicine sono proteine in grado di inibire la crescita di batteri della stessa specie o di specie diversa. Sono composte da due subunità: una in grado di causare lesioni alla cellula batterica e l'altra proteggente il batterio dalle proprie colicine (Hardy, 1975). Queste proteine possono essere codificate da geni localizzati nei plasmidi Col V presenti nella maggior parte degli *E. coli* patogeni (Wray e Woodward, 1997). Questi plasmidi contengono anche altri geni di patogenicità (Johnson J.R. *et al.*, 2003).

4.1.8.4.7 Capsula batterica

L'antigene capsulare K1, scarsamente immunogeno, è frequentemente presente negli APEC, in particolare in ceppi O1 e O2, ma anche in ceppi non tipizzabili (Gross, 1991; Dho-Moulin e Fairbrother, 1999). Mellata *et al.* (2003) hanno dimostrato che il polisaccaride O78 e la capsula K1 sono fattori di virulenza in grado di aumentare la sopravvivenza batterica nel siero e Pourbakhsh *et al.* (1997a) hanno osservato che tre ceppi APEC con antigene capsulare K1 erano più resistenti agli effetti battericidi del siero.

Epidemiologia e Patobiologia

4.2.1 Incidenza e distribuzione geografica

E. coli è un batterio commensale del tratto intestinale del pollame arrivando a concentrazioni di 10^6 UFC (unità formanti colonia) per grammo di feci. Quantità più elevate sono presenti nei giovani animali, in uccelli senza una microflora intestinale stabile e nel tratto più distale dell'intestino (Dominick e Jensen, 1984; Leitner e Heller, 1992; Wooley *et al.*, 1994).

In polli in buono stato di salute, il 10-15% dei coliformi intestinali può appartenere a sierotipi potenzialmente patogeni (Harry e Hemsley, 1965), anche se i ceppi intestinali sono raramente dello stesso sierotipo di quelli extra-intestinali. I ceppi di *E. coli* intestinali possono fungere da *reservoir* per fattori di virulenza e di antibiotico-resistenza (Nogrady *et al.*, 2006).

La trasmissione attraverso l'uovo di ceppi APEC è frequente e può essere causa di elevata mortalità in pulcini (Rosario *et al.*, 2004; Giovanardi *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006) e in tacchinotti (Giovanardi *et al.*, 2007). Ceppi di *E. coli* resistenti ai fluorochinoloni sono stati verticalmente trasmessi da polli riproduttori, clinicamente sani, causando alta mortalità nella progenie (Petersen *et al.*, 2006). La più importante fonte di infezione dell'uovo pare sia la contaminazione fecale della superficie, con conseguente penetrazione di *E. coli* attraverso il guscio e le membrane (Giovanardi *et al.*, 2005).

Le feci di topo possono contenere frequentemente coliformi patogeni e il loro intestino è l'ambiente ideale per il trasferimento di geni di resistenza tra ceppi batterici. L'esposizione dei topi agli antibiotici è in grado di accelerare questo processo (Hart *et al.*, 2006).

Sierotipi patogeni di *E. coli* possono essere introdotti negli allevamenti con acqua contaminata (Nagi e Mathey, 1972) ed essere trasmessi anche attraverso la contaminazione fecale degli abbeveratoi.

4.2.2 Ospiti naturali e sperimentali

La maggior parte, se non la totalità, delle specie aviari, è sensibile all'infezione da parte di *E. coli*. La malattia clinica è riportata più spesso in polli, tacchini e anatre (Barnes *et al.*, 2008). Animali di tutte le età possono essere colpiti dalla colibacillosi anche se i soggetti più giovani sono maggiormente e gravemente colpiti (Harry, 1957; Montgomery *et al.*, 1999; Johnson L.C. *et al.*, 2001). Focolai di colibacillosi sono riportati anche in galline ovaiole (Zanella *et al.*, 2000) e riproduttori (Jordan *et al.*, 2005).

4.2.3 Modalità di trasmissione

E. coli è presente nel tratto gastrointestinale e viene eliminato con le feci, spesso in elevata quantità. Feci infette possono veicolare ceppi di *E. coli* patogeni all'interno degli allevamenti di pollame. Da non sottovalutare il ruolo degli uccelli selvatici quali portatori di ceppi di *E. coli* già adattati alle specie aviari di allevamento (Barnes *et al.*, 2008). La trachea, i ciechi e l'ovidutto di galline ovaiole, precedentemente infettate con *E. coli*, possono rimanere colonizzati in modo persistente per almeno 21 settimane e gli animali depositare uova contaminate (Ardrey *et al.*, 1968).

Gli adulti e le larve di *Alphitobius diaperinus* (Goodwin e Waltman, 1996), come pure la mosca domestica (*Musca domestica*) (Rochon *et al.*, 2004) possono trasmettere *E. coli* all'interno dell'allevamento. Nell'intestino delle mosche può avvenire il trasferimento orizzontale di geni di antibiotico-resistenza e di virulenza (Petridis *et al.*, 2006).

4.2.4 Fattori predisponenti

Soggetti sani, con difese immunitarie non compromesse, sono di fatto resistenti a infezioni da ceppi APEC. Queste ultime sono spesso la conseguenza di una compromissione della integrità di barriere cutanee o mucosali (respiratorie o intestinali) o di una immunodepressione da cause diverse cause (virali, tossiche, stress ambientale). Un efficace controllo della colibacillosi dipende dall'identificazione e dall'eliminazione di questi fattori predisponenti (Barnes *et al.*, 2008). Ad esempio, l'infezione da HEV (Newberry *et al.*, 1993; Pierson *et al.*, 2006b; van den Hurk *et al.*, 1994) e l'esposizione ad alti livelli di ammoniaca (Oyetunde *et al.*, 1978; Nagaraja *et al.*, 1984) sono in grado di predisporre facilmente il tacchino alla colibacillosi.

4.2.5 Patogenesi

L'adesione ai tessuti epiteliali è la fase iniziale più importante nella patogenesi di infezione da *E. coli* (Moon, 1990). Arp e Jensen (1980), osservando che ceppi virulenti e fimbriati erano più persistenti nella trachea di tacchino rispetto a quelli privi, dimostrarono per la prima volta come la capacità adesiva di *E. coli* potesse essere un fattore di virulenza.

Gli APEC sono in grado di penetrare nell'organismo attraverso diverse vie (Barnes *et al.*, 2008):

- Apparato respiratorio: questi batteri patogeni, normalmente presenti nell'intestino, sono eliminati con le feci nell'ambiente. Queste escrezioni infette si essiccano e formano particelle di polvere contenenti un'elevata quantità di batteri che possono essere inalati dagli animali in allevamento. Partendo da lesioni del tratto respiratorio causate da ammoniaca,

polvere, forme virali come AMPV e ND, gli APEC possono facilmente raggiungere il torrente circolatorio.

- Apparato gastroenterico: gli APEC, residenti del tratto intestinale, possono convivere con la microflora commensale fino a quando quest'ultima non è compromessa da diversi fattori quali: cambiamenti alimentari, stress, coccidiosi, HEV e trattamenti antibiotici. L'indebolimento della flora batterica commensale favorisce l'adesione degli APEC ai villi intestinali e la loro penetrazione nel torrente circolatorio con conseguente setticemia. I batteri possono raggiungere anche le membrane sinoviali delle articolazioni e il midollo osseo.
- Apparato tegumentario: lesioni alla cute dovute a manipolazione, ferite da gabbia, punture da ectoparassiti possono compromettere l'integrità dell'epidermide e permettere l'entrata degli APEC nel circolo sanguigno.
- Apparato riproduttivo: il cannibalismo della cloaca e il suo prollasso, causato da una eccessiva dimensione dell'uovo, possono facilitare la penetrazione per via ascendente degli APEC fino all'ovidutto.

4.2.6 Segni clinici, morbilità e mortalità

I segni clinici non sono patognomonic. In allevamento si possono osservare soggetti con forme respiratorie di gravità variabile, depressione del sensorio, arruffamento del piumaggio, anoressia e scarsa tendenza al movimento. Questi soggetti cercano fonti di calore e si avvicinano l'uno all'altro. In fase avanzata i tacchini sono a terra e solamente se stimolati riprendono a camminare, ma solo per pochi istanti. Alcuni soggetti, specialmente gli adulti, possono mostrare segni di zoppia a uno o entrambi gli arti.

Sia la morbilità che la mortalità sono molto variabili. Gli episodi di mortalità si verificano spesso durante la notte e sono rilevati dall'allevatore durante la visita mattutina in allevamento (Barnes *et al.*, 2008).

4.1.9 Lesioni anatomo-patologiche

La colibacillosi aviare è tipicamente una malattia extraintestinale che si manifesta con lesioni differenti tra le quali aerosacculite, polmonite, cellulite, pericardite, periepatite e artrite. Questa malattia, in tutte le sue forme patologiche, riveste un ruolo molto importante nell'economia della produzione avicola mondiale in termini di mortalità, perdita di produzione e scarto delle carcasse al macello.

Nel tacchino la forma più comune di colibacillosi è la colissetticemia, causata dalla presenza di un ceppo virulento di *E. coli* nel torrente circolatorio. La gravità e la tipologia delle lesioni

sono determinate dalla virulenza del ceppo batterico e dallo stato immunitario dell'animale al momento della infezione (Pourbakhsh *et al.*, 1997b; Pourbakhsh *et al.*, 1997c).

La colisetticemia progredisce attraverso queste fasi: setticemia acuta, polisierosite subacuta e infiammazione cronica granulomatosa (Cheville e Arp, 1978). Alla necropsopia si rileva colorazione verdastra degli organi colpiti, che emanano un odore tipico probabilmente dovuto alla produzione di indolo da parte del microrganismo. Una lesione molto comune della colisetticemia è la pericardite, che è spesso associata a miocardite (Gross, 1966). Inizialmente all'interno del sacco pericardico si accumula un essudato liquido e torbido che in seguito viene sostituito da materiale fibrinoso. Con il progredire della malattia, l'epicardio aderisce tenacemente al sacco pericardico per la presenza di materiale fibrinoso-caseoso.

Le forme cliniche di colisetticemia possono essere distinte a seconda delle modalità di invasione del torrente circolatorio da parte di *E. coli* patogeni (Barnes *et al.*, 2008).

4.2.7.1 Colisetticemia di origine respiratoria

In questa forma clinica, comune nel pollo, *E. coli* accede al torrente circolatorio a seguito di lesioni della mucosa respiratoria sia di natura infettiva che non (Gross 1961; Ginns *et al.*, 1998). Ad esempio, è stato dimostrato che AMPV può aumentare la sensibilità dei tacchini alla colisetticemia (Al-Ankari *et al.*, 2001; Van de Zande *et al.*, 2001; Turpin *et al.*, 2002; Jirjis *et al.*, 2004). Le lesioni anatomopatologiche macroscopiche sono inizialmente prevalenti a livello dell'apparato respiratorio (trachea, polmoni, sacchi aerei), per poi estendersi anche al pericardio. I polmoni appaiono colpiti da un'infiammazione fibrinosa con pleurite adesiva (Barnes *et al.*, 2008).

4.2.7.2 Colisetticemia di origine enterica

Questa forma di colisetticemia è più comune nel tacchino. *E. coli* giunge nel torrente circolatorio a seguito della compromissione dell'integrità della mucosa intestinale da parte di agenti infettivi. Il più comune di questi è HEV (Newberry *et al.*, 1993; van den Hurk *et al.*, 1994; Pierson *et al.*, 1996b). Le lesioni macroscopiche rispecchiano quelle di una forma acuta di colibacilloso (Cheville e Arp, 1978) con congestione e colorazione verdastra del fegato, splenomegalia e congestione dei muscoli. Dopo pochi giorni, gli animali possono sviluppare lesioni simili a quelle della colisetticemia di origine respiratoria (Barnes *et al.*, 2008).

4.2.7.3 Osteoartrite e sinovite

La localizzazione di *E. coli* nelle ossa e nelle membrane sinoviali articolari è una comune conseguenza della colisettemia. *E. coli* giunge in questi distretti a seguito di diffusione ematogena, favorita ad esempio da HEV nel tacchino (van den Hurk *et al.*, 1994; Droual *et al.*, 1996), e non viene sufficientemente contrastato dalle cellule della risposta immunitaria.

Clinicamente si osserva zoppia, da lieve a grave, con riduzione del peso corporeo. Gli animali sono oggetto di episodi di cannibalismo e presentano lesioni cutanee con perdita di sangue. Comparati ad animali normali, i tacchini zoppi presentano peso del fegato e della milza più elevato, minore peso corporeo, diminuita immunità cellulo-mediata, una normale immunità anticorpale, diminuzione dei linfociti circolanti e aumento dei monociti e degli eterofili (Mutalib *et al.*, 1996). Le ossa maggiormente colpite sono il tibiotarso, il femore, le vertebre toracolombari e l'omero. In generale, le fisi prossimali delle ossa lunghe sono più colpite rispetto a quelle distali (Mutalib *et al.*, 1996). Le osteomieliti sono facilmente identificabili con il taglio e l'esposizione della fisi, ma piccole lesioni possono essere osservate solo microscopicamente (McNamee e Smyth, 2000).

L'artrite è più comune alle articolazioni tibiotarso-metatarsica, femoro-tibio-rotulea e coxo-femorale, mentre le lesioni in altre articolazioni sono meno frequenti (Mutalib *et al.*, 1996).

4.3 Diagnosi

La diagnosi di laboratorio si basa sull'isolamento e sull'identificazione di *E. coli* da lesioni tipiche di colibacillosi. È necessario porre attenzione al fine di evitare una contaminazione fecale dei campioni da sottoporre ad analisi, e l'isolamento da visceri di soggetti in decomposizione deve essere interpretato con cautela in quanto *E. coli* diffonde rapidamente agli organi partendo dal tratto intestinale degli uccelli morti. Le colture da midollo osseo sono facili da eseguire e sono prive di batteri contaminanti. Gli organi e gli essudati da analizzare devono essere seminati su terreni selettivi come Eosin Methylene Blue (EMB) agar, MacConkey agar e Tergitol agar, come pure su *medium* non selettivi come l'agar sangue. Si può formulare una diagnosi presuntiva di infezione solo osservando, dopo incubazione a 37 °C per 24 ore, numerose colonie riferibili ad *E. coli* sulle piastre. Alcuni ceppi di *E. coli* possono fermentare il lattosio lentamente oppure essere lattosio negativi. La tipizzazione definitiva si basa sull'identificazione delle caratteristiche biochimiche dell'organismo (vedi 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5). In commercio sono disponibili numerose gallerie miniaturizzate per l'identificazione rapida del batterio (Barnes *et al.*, 2008).

La ricerca di sierotipo, patotipo, resistotipo e il *fingerprinting* dell'isolato possono essere utili specialmente quando si effettuano studi epidemiologici.

Anche se la sierologia non viene utilizzata come strumento diagnostico, dopo l'infezione vi è produzione di anticorpi evidenziabili meglio con test ELISA, piuttosto che attraverso la siero agglutinazione diretta (Leitner *et al.*, 1990).

4.4 Profilassi e controllo della malattia

4.4.1 Interventi di management

La trasmissione di *E. coli* dai riproduttori alla loro progenie avviene attraverso la contaminazione fecale delle uova da cova. È necessario raccogliere le uova frequentemente, mantenere pulito il nido di schiusa, eliminare uova a terra, rotte o con contaminazione fecale superficiale evidente. La popolazione di *E. coli* sulla superficie del guscio può essere ridotta o eliminata attraverso disinfettanti (Shane e Faust, 1996) o con l'utilizzo di radiazioni ultraviolette, senza alterare la percentuale di schiusa (Coufal *et al.*, 2003).

In allevamento è indispensabile mantenere un buon ricambio di aria e un'ottima qualità della lettiera al fine di ridurre il rischio di episodi di colibacillosi (Davis e Morishita, 2005). La malattia è stata riprodotta sperimentalmente in polli commerciali variando la temperatura ambientale e modulando il flusso di aria (Jiang *et al.*, 2005). Un'appropriata ventilazione è in grado di limitare le microlesioni della mucosa tracheale causate dall'ammoniaca e di ridurre i livelli aerogeni dei batteri e delle loro endotossine. Il danno alla mucosa respiratoria è proporzionale alla quantità di ammoniaca a cui gli animali sono esposti (Nagaraja *et al.*, 1983). L'ammoniaca, anche a livelli non percepiti dall'olfatto umano, è in grado di ridurre la *clearance* mucociliare dei microrganismi inalati (Oyetunde *et al.*, 1978; Nagaraja *et al.*, 1984).

4.4.2 Vaccinazione

È stata sviluppata e implementata un'ampia varietà di vaccini e di metodi di vaccinazione. Tra i vaccini vi sono prodotti spenti inattivati e vivi attenuati mutanti. Tuttavia, molti di questi presidi non sono mai andati oltre la fase sperimentale e nessun vaccino è largamente utilizzato nell'industria avicola.

4.4.2.1 Vaccini inattivati

In commercio è presente, ma poco diffuso in Italia, un prodotto contenente una sospensione dell'antigene fimbriale F11 (*PapA*) e dell'antigene flagellare (FT). Questo vaccino è utilizzato nei polli riproduttori al fine di conferire immunità passiva alla progenie (Nobilis *E. coli* Inac. Intervet-Shering Plough Animal Health, USA). Si consiglia la prima vaccinazione a 6-12

settimane di età e la seconda a 14-18. Altri vaccini, inattivati nei confronti di diversi sierotipi, come O2:K1 e O78:K80, sono stati sviluppati sperimentalmente ma, a fronte di una buona protezione omologa, scarsa o nulla era quella eterologa (Deb e Harry, 1976 e 1978; Cessi, 1979; Arp, 1982; Trampel e Griffith, 1997).

4.4.2.2 Vaccini vivi attenuati mutanti

Un vaccino costituito da un ceppo virulento APEC O2 con mutazione *carAB*, utilizzato in prove sperimentali, si è mostrato promettente. Esperimenti *in vivo* hanno dimostrato che è in grado di creare un'infezione autolimitante per la scarsa capacità di sopravvivenza nell'organismo. I tacchini vaccinati per via orale con questo vaccino mutante erano protetti contro la colibacillosi in un modello di infezione che comprendeva anche il virus HEV (Kwaga *et al.*, 1994).

In commercio è attualmente disponibile nel pollo da carne un vaccino vivo mutante *aroA* deleto (POULVAC ® E. COLI, Fortdodge, USA) sierotipo O78:K80, da somministrare ad un giorno di età via spray con replica a 12-14 settimane negli animali a lunga vita (riproduttori e galline ovaiole).

4.4.3 Trattamento

4.4.3.1 Farmaci antimicrobici

I farmaci antimicrobici sono utilizzati nel mondo avicolo già dalla metà degli anni Cinquanta. Parallelamente al loro utilizzo è stato segnalato lo sviluppo di antibiotico-resistenza che fu notata per la prima volta per le tetracicline (Sojca e Carnaghan, 1961). La resistenza agli antibiotici è determinata geneticamente ed è solitamente trasferibile all'interno di una stessa specie o tra specie differenti attraverso elementi genetici mobili come plasmidi, integroni, trasposomi (Bass *et al.*, 1999; Lanz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004). I più grandi *reservoir* di geni di antibiotico-resistenza nell'allevamento aviario sono i batteri Gram-positivi che formano più dell'85% della flora batterica della lettiera (Nandi *et al.*, 2004). Da sottolineare che l'intestino dei polli è un ambiente favorevole per il trasferimento di geni di resistenza alle tetracicline da *E. coli* resistenti a ceppi sensibili (Hart *et al.*, 2006).

Da diversi anni il fenomeno della antibiotico-resistenza multipla (vale a dire a più farmaci) è in aumento nei ceppi aviari di *E. coli*. Inoltre, il mondo scientifico è in allarme per il possibile trasferimento di resistenze dai ceppi animali a quelli umani. Appare quindi necessario evitare l'abuso di antibiotici per il trattamento delle malattie batteriche nel pollame.

Dalla metà degli anni Novanta, i fluorochinoloni sono stati autorizzati in tutto il mondo per il trattamento della colibacillosi aviaria e si sono dimostrati da subito molto efficaci (Glisson *et al.*, 2004). Recentemente il loro utilizzo è stato bandito negli Stati Uniti a causa dello sviluppo di resistenze da parte di alcuni ceppi di *E. coli* (Bazile-Pham-Khal *et al.*, 1996; Giraud *et al.*, 2001) e per la resistenza crociata verso altri farmaci della stessa classe utilizzati per la terapia in medicina umana (White, 2006).

Attualmente i ceppi di *E. coli* sono frequentemente resistenti a tetracicline, sulfamidici, ampicillina e streptomina (Vandemaele *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2006; White, 2006) e il fenomeno della resistenza multipla (Vandemaele *et al.*, 2002) è stato riscontrato anche in ceppi con fattori di virulenza (APEC) (Johnson T.J. *et al.*, 2004).

Numerosi e recenti sono gli studi relativi al fenomeno dell'antibiotico-resistenza in ceppi di *E. coli* isolati da tacchini (Salmon e Watts, 2000; Cormican *et al.*, 2001; Altekruze *et al.*, 2002) dove le resistenze dei ceppi commensali (AFEC) sono a volte più elevate rispetto agli APEC (es. per l'ampicillina) (Salmon e Watts, 2000). Una alta percentuale di *E. coli* isolati da tacchini sono resistenti alla gentamicina, fenomeno attribuito alla pratica di iniezione dei tacchinotti in incubatoio con questo farmaco (Salmon e Watts, 2000).

4.4.3.2 Altri trattamenti

La sempre minore disponibilità in commercio di antibiotici disponibili per il tacchino e l'aumento dell'antibiotico-resistenza ha stimolato interesse verso metodi di trattamento alternativi come prebiotici, probiotici, enzimi, acidificanti intestinali, vitamine, stimolatori immunitari, farmaci anti infiammatori e altri prodotti antimicrobici.

Sebbene prebiotici e probiotici siano largamente utilizzati nell'industria avicola, sono disponibili pochi studi attestanti la loro efficacia relativamente ad *E. coli*. La colonizzazione di questo batterio al momento della schiusa rende essenziale l'utilizzo molto precoce di probiotici (Edens *et al.*, 1997). La somministrazione di un ceppo di *Lactobacillus plantarum* F1, produttore di batteriocine, è in grado di proteggere i pulcini nei confronti di un'infezione sperimentale con APEC O2 (Moran *et al.*, 2006).

In aggiunta ai lattobacilli, altri batteri possono inibire la colonizzazione di *E. coli*. Ceppi specifici di *Bacillus* spp. inibiscono la colonizzazione del tratto intestinale da parte di *E. coli* e sono potenzialmente utilizzabili come probiotici (La Ragione *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2005). Le spore di *Bacillus* spp., altamente resistenti nell'ambiente, sono facilmente somministrate agli animali attraverso il mangime.

L'esclusione competitiva, mediante la somministrazione di una flora batterica ai pulcini di un giorno di vita, è in grado di ridurre la colonizzazione intestinale degli APEC (Hofacre *et al.*, 2002).

La somministrazione di batteriofagi fornisce un'ulteriore alternativa al trattamento antibiotico della colibacillosi (Barrow *et al.*, 1998; Brussow, 2005). Due batteriofagi isolati da acqua di fogna, in grado di lisare un APEC O2, in condizioni sperimentali si sono dimostrati efficaci nel ridurre la mortalità da colibacillosi indotta da un ceppo APEC omologo (Huff *et al.*, 2002).

Capitolo 5

Interazione tra agenti infettivi

L'associazione tra sintomatologia clinica, mortalità da colibacillosi e presenza di lesioni riferibili ad HEV a livello splenico, ha fatto ipotizzare che questo virus possa spesso esacerbare, in condizioni di campo, la colibacillosi. Sponenberg *et al.* (1985), in un monitoraggio effettuato negli Stati Uniti, hanno per la prima volta correlato temporalmente l'infezione da HEV con episodi di colibacillosi in tacchini di età compresa tra 6 e 12 settimane. Gli Autori hanno osservato una mortalità media tra il 3 e il 5% con punta massima dell'8%. Le lesioni comunemente osservate erano: splenomegalia con aspetto marmorizzato della milza, epatomegalia con aumentata friabilità del parenchima epatico e duodenite con presenza di catarro intestinale di colore brunastro. Più tardivamente gli animali hanno esibito difficoltà di movimento e zoppia causate da infezione articolare di *E. coli*.

In Italia, Ceruti *et al.* (2007) hanno evidenziato, in tacchini riproduttori di 20 settimane, un calo di produzione di uova ascrivibile ad infezione da HEV. Gli stessi Autori hanno rilevato anche una successiva forma respiratoria causata da AMPV e mortalità da colibacillosi.

L'interazione tra *E. coli* ed HEV è stata studiata anche in condizioni sperimentali (Larsen *et al.*, 1985). In questo studio gli Autori hanno dimostrato che la mortalità da colibacillosi era più elevata in tacchinotti infettati con HEV e successivamente con *E. coli* O1:K1. Newberry *et al.* (1993) hanno indotto sperimentalmente alta mortalità (23%) in tacchinotti infettati con *E. coli* O1:K1 ed HEV. Van den Hurk *et al.* (1994) hanno osservato maggiore mortalità (61%) in tacchini inoculati con *E. coli* O78 ed HEV rispetto a soggetti infettati con i singoli agenti patogeni. L'inoculazione endovenosa di *E. coli* O78, anche in assenza di HEV, ha causato lesioni articolari.

In condizioni di campo è stato documentato che le infezioni, in varie combinazioni, da HEV, *Bordetella avium* (BA), virus della malattia di Newcastle (NDV) e *Mycoplasma meleagridis* (MM), favoriscono la mortalità da colibacillosi in tacchini di 6-12 settimane di età (Pierson *et al.*, 1996b).

A livello sperimentale è stato rilevato che tacchini infettati con NDV, BA, HEV ed *E. coli* hanno mostrato mortalità più elevata rispetto a quella provocata dalle singole infezioni (Pierson *et al.*, 1996a). Al-Ankari *et al.* (2001) hanno evidenziato sperimentalmente un effetto sinergico tra AMPV ed *E. coli* nel determinismo della sintomatologia clinica e delle lesioni anatomico-patologiche di colibacillosi.

Una grave sintomatologia respiratoria nei polli, con seni infraorbitali gonfi e scolo nasale, è stata riprodotta sperimentalmente con la duplice infezione da AMPV e BA. La perdita delle ciglia vibratili presenti sull'epitelio tracheale, causata da BA, ha favorito l'infezione da AMPV permettendo una penetrazione più profonda del virus nell'apparato respiratorio (Jirjis *et al.*, 2004).

Turpin *et al.* (2002) hanno osservato maggiore mortalità in tacchini infettati sperimentalmente con AMPV e ND e con AMPV ed *E. coli* rispetto alle singole infezioni. Van de Zande *et al.* (2001) hanno studiato gli effetti di una duplice infezione da AMPV ed *E. coli*. I risultati hanno dimostrato che AMPV è in grado di predisporre l'apparato respiratorio alla colonizzazione ed invasione batterica attraverso un'alterazione della normale attività del sistema mucociliare durante la replicazione del virus, con conseguente invasione di *E. coli* nelle parti più profonde dell'apparato respiratorio.

PARTE SPERIMENTALE

Studio A

STUDIO PILOTA: RISPOSTA ANTICORPALE DEL TACCHINO ALLA SOMMINISTRAZIONE DI VACCINI COMMERCIALI PER HEV ED AMPV

A.1 Introduzione

Lo scopo di questo studio preliminare era di valutare la sieroconversione evocata nel tacchino a seguito delle vaccinazioni nei confronti di HEV e di AMPV, al fine di ottenere una curva di riferimento da utilizzare nell'interpretazione dei risultati dei successivi studi longitudinali di campo (studio B).

Il vaccino vivo per AMPV sottotipo B è stato somministrato via spray ad un giorno di vita in incubatoio, rispettando la modalità e la tempistica aziendale. Per quanto riguarda HEV è stato utilizzato un vaccino commerciale spento. Per quest'ultimo presidio immunizzante si è voluto valutare la differenza in risposta anticorpale in animali inoculati una sola volta a 4 settimane rispetto a soggetti ricevuti un doppio intervento a 4 e 8 settimane di età come descritto nel foglietto illustrativo del vaccino stesso.

A.2 Materiali e metodi

A.2.1 Animali utilizzati nella prova

Trenta tacchini commerciali di un giorno di età metà femmine e metà maschi sono stati accasati in allevamento in assenza di altri animali presenti (periodo interciclo) dopo aver eseguito le routinarie operazioni di pulizia e disinfezione del capannone.

A.2.2 Vaccini

Sono stati utilizzati il vaccino vivo attenuato Rhinovax ® (Merial, Francia), contenente ceppo AMPV sottotipo B, e il vaccino spento EE LAYERPLUS ® (Merial) contenente sia HEV,

ceppo Domermuth inattivato, con titolo non inferiore a 1 U AGP, che il virus della malattia di Newcastle ceppo Ulster 2C.

A.2.3 Piano sperimentale

Tutti i tacchini sono stati vaccinati via spray in incubatoio con vaccino vivo attenuato per AMPV e accasati in 3 gruppi di 10 soggetti ciascuno. Ogni gruppo comprendeva 5 maschi e 5 femmine. I gruppi sono stati vaccinati per HEV come di seguito riportato:

- Gruppo A: 2 interventi a 29 e 54 giorni con 0,25 ml per via sottocutanea;
- Gruppo B: 1 intervento 29 giorni con 0,25 ml per via sottocutanea;
- Gruppo C: non vaccinati per HEV.

Tutti i soggetti sono stati sottoposto a prelievo di sangue per esami sierologici nei riguardi di HEV ed AMPV alla 1^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a, 8^a, 10^a, 11^a, 13^a settimana. Dopo l'ultimo prelievo tutti i soggetti sono stati soppressi. Una volta giunti in laboratorio i campioni di sangue sono stati centrifugati e il siero recuperato e mantenuto ad una temperatura di -20 °C in attesa delle analisi.

A.2.4 ELISA per HEV

Per la ricerca di anticorpi nei riguardi di HEV è stato utilizzato il kit commerciale SYMBIOTICS ProFLOK® HEV (SYMBIOTICS CORPORATION, USA). Nell'esecuzione della prova sono state seguite le istruzioni della casa produttrice. I risultati sono stati espressi in densità ottica (*Optical Density-O.D.*) ed il valore di *cut-off* settato a 300 O.D. I valori di densità ottica sono stati misurati con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm. Le medie dei titoli anticorpali dei tre gruppi sono state paragonate tra loro utilizzando il test *t* di Student. Con *p*-value < 0,05, la differenza è stata considerata statisticamente significativa.

A.2.5 ELISA per AMPV

Per la ricerca di anticorpi nei riguardi di AMPV è stato utilizzato il kit ELISA indiretta *home-made* messo a punto e validato presso il Laboratorio Tre Valli afferente al gruppo zootecnico integrato Veronesi. La prova è stata eseguita secondo la metodica interna al laboratorio (codice DAQIOSI000034 rev. 0) di seguito brevemente descritta. Una quantità di 100 µl di ogni campione di siero diluito 1/500 è stato distribuito nei pozzetti della piastra; quest'ultima è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo incubazione, è stato eliminato il siero e i pozzetti lavati con *Phosphate Buffer Saline* (PBS) e acqua distillata. Il reagente coniugato, precedentemente preparato, è stato distribuito in quantità di 100 µl in ogni pozzetto e, successivamente, la piastra è stata lasciata 30 minuti a temperatura ambiente. Al

termine di questa incubazione, la piastra è stata lavata come descritto in precedenza ed ogni pozzetto è stato riempito con 100 µl di reagente substrato. A questo punto la piastra è stata lasciata a temperatura ambiente 10 minuti controllando l'intensità di colorazione dei pozzetti. In seguito è stato aggiunto ad ogni pozzetto un reagente per fermare la reazione alla O.D. desiderata dei sieri di riferimento. I valori in densità ottica sono stati misurati con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm. Il valore di *cut-off* è 300 O.D.

A.3 Risultati

L'andamento dei valori anticorpali per HEV è apprezzabile nella figura A.1. Dopo la scomparsa degli anticorpi materni, a 4 settimane di vita, non si osserva sierconversione sia a seguito di vaccinazione singola (gruppo B) che duplice (gruppo A). Nessuna differenza statisticamente significativa ($p > 0,05$), si è osservata tra i titoli anticorpali dei gruppi vaccinati una o due volte ed il gruppo non vaccinato per HEV.

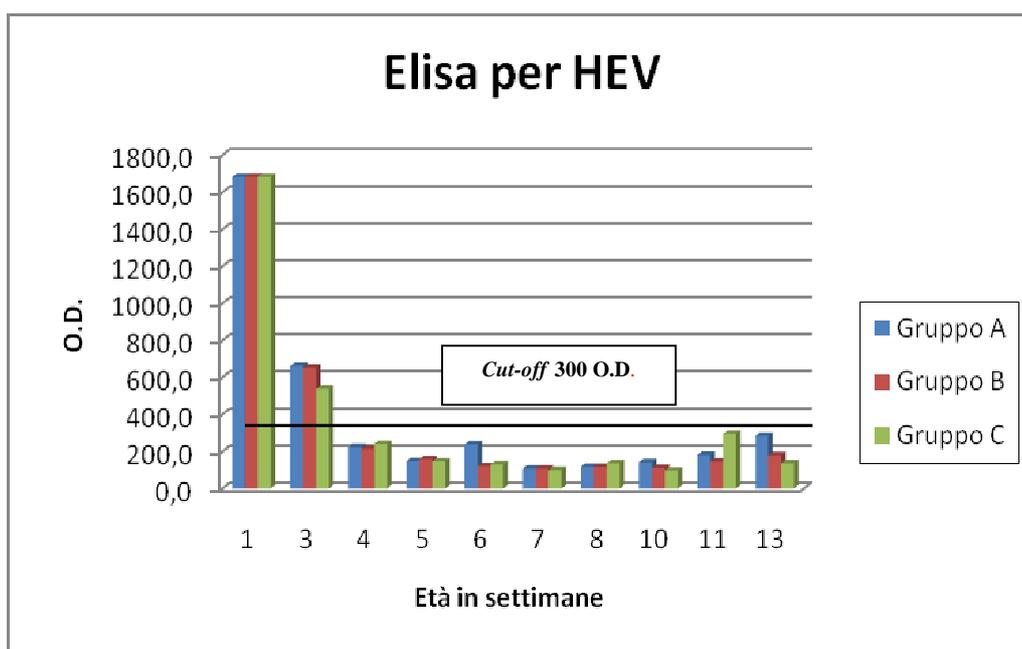


Figura A.1: Andamento della risposta anticorpale al vaccino per HEV nei gruppi A, B, C. I valori sono espressi in densità ottica (*Optical Density*-O.D.).

Nella figura A.2 si può invece osservare come gli anticorpi materni per AMPV siano decaduti progressivamente fino a scomparire a 3 settimane di età. Un lieve rialzo anticorpale si osserva a partire dalla 10^a settimana di vita.

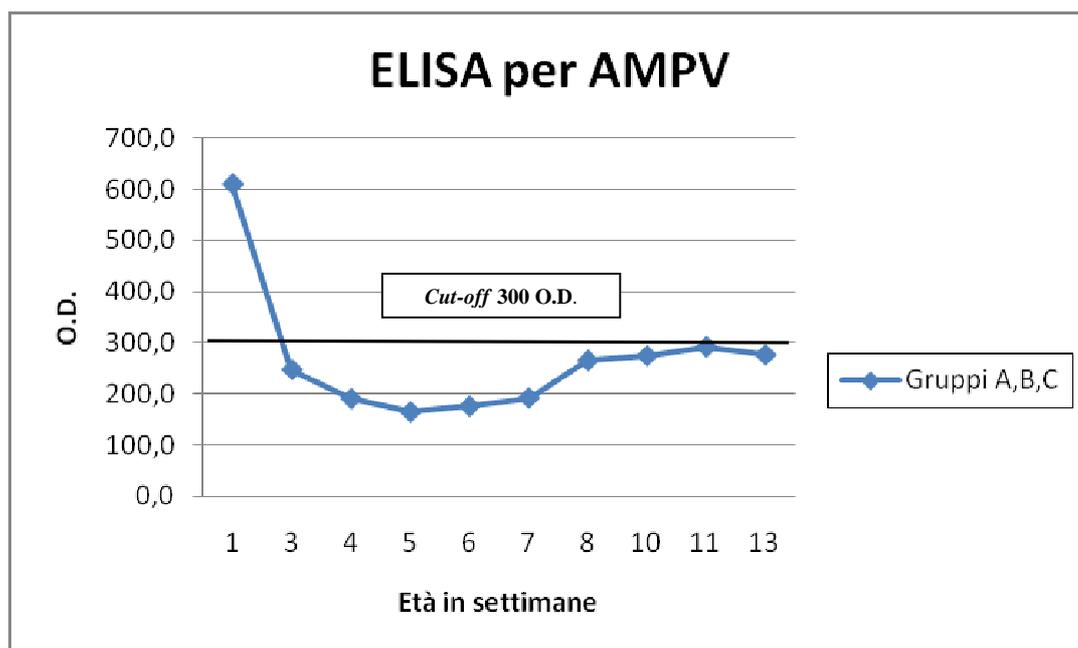


Figura A.2: Andamento della media dei titoli anticorpali per AMPV nei tre gruppi sperimentali. I valori sono espressi in densità ottica (*Optical Density-O.D.*).

A.4 Discussione

Questa prova ha permesso di osservare come, sia a seguito di unico che doppio intervento con vaccino inattivato per HEV, nel tacchino non si abbia produzione di anticorpi circolanti rilevabili con il test ELISA.

Riguardo AMPV, la presenza di anticorpi nelle prime due settimane di vita è con ogni probabilità riconducibile ad immunità materna, visto l'elevato titolo anticorpale ad un giorno di vita e il suo progressivo decadimento sino alla 5^a settimana, quando si comincia ad osservare un lieve rialzo anticorpale, che rimane comunque sempre inferiore al *cut-off* di 300 O.D.

I risultati ottenuti in questo studio sono importanti per interpretare eventuali sier conversionsi nei confronti di AMPV e HEV rilevate nello studio successivo B, svolto in allevamento, nei quali gli animali sono stati vaccinati per AMPV e HEV una sola volta, come nel gruppo B.

Studio B

INTERAZIONE TRA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE*, VIRUS DELL'ENTERITE EMORRAGICA ED *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO DA CARNE

B.1 Introduzione

Lo scopo del presente studio, in assenza di ricerche più approfondite nel tacchino da carne, è stata la valutazione, in condizioni di campo, della possibile interazione tra AMPV, HEV e APEC al fine di documentare meglio il ruolo di tali agenti virali nel determinismo della colibacillosi.

A tal fine sono stati eseguiti tre studi longitudinali consecutivi in tre gruppi di tacchini da carne di un allevamento del Nord-Est Italia, sino alla 14^a settimana di vita:

- Quotidianamente è stata registrata la mortalità da colisetticemia e sulle carcasse sono stati eseguiti esami necroscopici;
- Dalle lesioni indicative di colibacillosi sono stati eseguiti esami batteriologici per ricerca di *E. coli*;
- E' stata eseguita settimanalmente la ricerca di AMPV da tamponi rinofaringei mediante RT-PCR ed isolamento virale. I campioni positivi per AMPV sottotipo B sono stati successivamente differenziati in ceppi di campo e vaccinali mediante *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP);
- HEV è stato ricercato settimanalmente con PCR da tamponi cloacali e saltuariamente da milze;
- Sono stati eseguiti, sempre settimanalmente, esami sierologici nei riguardi di HEV ed AMPV.

A fine studio sono stati eseguiti esami sierologici per *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) per escluderne la presenza.

B.2 Materiali e metodi

B.2.1 Allevamento oggetto dell'indagine

È stato oggetto d'indagine un allevamento di tacchini maschi da carne ibridi commerciali B.U.T Big 6 afferenti ad un'azienda integrata dell'Italia settentrionale che, su tutto il territorio nazionale, produce circa 18 milioni di tacchini all'anno. Sono stati seguiti tre cicli produttivi consecutivi di circa 5000 soggetti ciascuno. L'allevamento era situato nella provincia di Verona, comune di San Martino Buon Albergo. Gli animali sono stati vaccinati per AMPV in incubatoio via spray con vaccino vivo attenuato sottotipo B, ed hanno ricevuto un intervento per via sottocutanea di vaccino spento per HEV a 28 giorni.

B.2.2 Campionamento

B.2.2.1 Tamponi

Le infezioni da AMPV e HEV hanno una morbilità che facilmente raggiunge il 100% (Domermuth *et al.*, 1972; Stuart, 1989; Pierson *et al.*, 1996a) e quindi prevalenze attese sicuramente superiori al 25%. Da calcoli statistici, se la popolazione di ciascun ciclo di allevamento è > 3500 soggetti, 10 campioni per gruppo di animali sono sufficienti per evidenziare l'infezione con un livello di confidenza del 99% (Canon e Roe, 1982).

In ogni ciclo, il campionamento per AMPV ed HEV è stato quindi eseguito su 10 soggetti selezionati sul totale dei presenti in allevamento. Ogni settimana, a partire dalla 2^a fino alla 14^a compresa, sono stati eseguiti su ogni animale:

- un tampone rino-faringeo per la ricerca di AMPV con RT nested-PCR;
- un tampone rino-faringeo per l'isolamento di AMPV
- un tampone cloacale per la ricerca di HEV con PCR.

I campioni sono stati processati in *pool* da 10 per giorno di campionamento. I tamponi per l'isolamento virale venivano immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di refrigerazione sino all'arrivo in laboratorio, mentre quelli per PCR erano lasciati asciugare all'aria prima di essere riposti nella custodia. Tutti i campioni erano conservati in laboratorio in congelatore alla temperatura di -80 °C sino alla processazione.

B.2.2.2 Prelievi di sangue per esami sierologici

Ogni settimana, dalla 3^a alla 14^a, sono stato effettuati prelievi di sangue per valutare con test ELISA la presenza nel siero di anticorpi specifici verso gli antigeni virali HEV ed AMPV. A fine

studio sono stati eseguiti esami sierologici per MG e MS mediante ELISA per escluderne la presenza.

B.2.2.3 Registrazione sintomatologia clinica, mortalità ed esami necroscopici

Quotidianamente i gruppi venivano osservati per evidenziare eventuale comparsa di sintomatologia clinica respiratoria e mortalità riferibile a colibacillosi. Tutti i soggetti morti, o soppressi perché in evidente stato di sofferenza, venivano sottoposti ad esame necroscopico prendendo in considerazione, come lesioni indicative di colibacillosi: pericardite, aerosacculite, polmonite fibrinosa, epato-splenomegalia ed artrotenosinovite. Da questi soggetti venivano eseguiti i prelievi per gli esami batteriologici.

B.2.2.4 Prelievi da carcasse

Il campionamento per la ricerca di *E. coli* è stato effettuato su tutti gli animali con lesioni riferibili a colisetticemia. L'esame batteriologico è stato tentato da almeno un viscere o essudato per soggetto, o gruppo di animali, in caso di lesioni macroscopiche analoghe. Quando era presente artrotenosinovite, in soggetti con problemi evidenti di deambulazione, il campionamento comprendeva una o più articolazioni, anche dallo stesso animale. Quando erano anche presenti lesioni spleniche indicative di infezione da HEV (milza marmorizzata), dalle milze veniva effettuata la ricerca del virus mediante PCR.

B.2.2.5 Numeri di accettazione

Tutti i campioni venivano accettati con un numero univoco. Nel caso di matrice organica sottoposta ad esame batteriologico, al numero si abbinava il nome dell'organo. Ad esempio: **13432-1 cervello**. In caso di matrici doppie provenienti dallo stesso animale (es. articolazioni e polmoni) si aggiungeva, dopo il nome della matrice organica il numero 1 o 2.

B.2.3 RT nested-PCR specifica per AMPV sottotipo A e B

Questa tecnica, basata sulla sequenza del gene G, è in grado di evidenziare e differenziare AMPV sottotipo A e B. L'RNA virale è stato estratto da ogni *pool* di 10 tamponi rino-faringei, mediante un kit del commercio attenendosi alle istruzioni del produttore (QIAamp viral Mini Kit, Qiagen, Germania). La RT nested-PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Naylor *et al.* (1997) e Cavanagh *et al.* (1999). Il prodotto dell'amplificazione, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% è stato visualizzato mediante colorazione con Sybersafe™ DNA gel staining (Invitrogen, USA). In presenza di AMPV appartenente al sottotipo B si ottiene un amplificato di 340 bp, mentre in presenza del sottotipo A si ottiene un frammento di 270 bp; la

specificità delle bande ottenute è stata valutata mediante marker di riferimento (Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen).

B.2.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) per discriminare fra ceppi di campo e ceppi vaccinali

Sui prodotti di PCR di AMPV appartenenti al sottotipo B, è stata eseguita RFLP in grado di distinguere fra ceppi di campo e vaccinali (VCO3) secondo la metodica descritta da Lupini *et al.* (2010). L'enzima di restrizione *Mse*I è stato usato per digerire i prodotti ottenuti mediante RT nested-PCR. Dopo la digestione, i frammenti di DNA ottenuti sono stati separati in gel di agarosio e visualizzati come descritto al paragrafo B.2.3. La presenza del residuo A in posizione 91 della sequenza nucleotidica del gene G del ceppo vaccinale, fa sì che il prodotto RT nested-PCR venga tagliato dall'enzima in 2 frammenti di 300 e 40 pb ciascuno. L'avvenuta digestione enzimatica è stata verificata mediante confronto col prodotto di PCR non sottoposto a taglio enzimatico e marker di riferimento.

B.2.5 Isolamento di AMPV

L'isolamento di AMPV è stato eseguito solo dai *pool* di tamponi rino-faringei i cui corrispettivi tamponi a secco erano risultati positivi per AMPV alla RT-nested PCR. Sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo (*Tracheal Organ Culture* – TOC). Queste sono state preparate a partire da uova embrionale *specific pathogen free* di pollo (SPF) al 18°-20° giorno di incubazione. AMPV è in grado d'infettare e successivamente produrre ciliostasi, visibile al microscopio ottico rovesciato in queste colture.

Ogni TOC è stata inoculata con 0,1 ml di un campione in esame; sono state utilizzate dieci TOC per campione.

Giornalmente le colture inoculate sono state osservate al microscopio ottico rovesciato per valutare la motilità ciliare. Dopo 4 giorni, il terreno di 5 TOC per ogni campione veniva raccolto, aliquotato e posto nel congelatore a -80°C per ulteriori passaggi. Le restanti colture sono state osservate fino a 7-10 giorni post-inoculazione per valutare l'eventuale comparsa di ciliostasi. I campioni che determinavano ciliostasi su TOC erano considerati positivi e la conferma dell'isolamento virale era eseguita mediante RT nested-PCR (paragrafo B.2.3).

B.2.6 PCR per HEV

La PCR per HEV è stata eseguita secondo il metodo (codice DAQIOBM000020 rev.7) messo a punto e validato presso il laboratorio Tre Valli afferente al gruppo integrato Veronesi, di

seguito brevemente descritto. Il DNA virale è stato estratto, sia dai tamponi cloacali che dalle milze, con *PureLink Genomic DNA kit* (Invitrogen) seguendo le istruzioni della casa produttrice. L'amplificazione è stata eseguita con Taq PCR Master Mix (Qiagen) in 20 µl di mix di reazione contenente 2 µl di DNA (20 ng/µl) e 0,2 µM di *primer* specifici per l'identificazione di HEV e 0,1 uM di *primer* per amplificazione di un controllo interno di reazione (gene *luc* della luciferasi). I *primer* specifici per HEV, disegnati sul gene che codifica per l'esone sono:

- *forward* "GGC ATG GGC AAC TAT CCT AA"
- *reverse* "TAG GAA CAC TGC CAA AAC CC"

Il ciclo di reazione utilizzato è stato: 2 min a 95 °C, 35 cicli di 30 sec a 94 °C, 30 sec a 55 °C, 30 sec a 72 °C e per ultimo un ciclo a 72 °C per 10 min.

Gli amplificati sono stati visualizzati tramite corsa elettroforetica in gel d'agarosio e acquisizione dell'immagine con Gel Doc 2000 (Bio-Rad, USA), la banda attesa per HEV era di 118 bp.

B.2.7 ELISA per la ricerca degli anticorpi per HEV e AMPV

Gli esami sierologici mediante ELISA per la ricerca di anticorpi nei riguardi di HEV ed AMPV sono stati eseguiti come descritto nello studio A. I valori in densità ottica (*optical density-O.D.*) sono stati misurati con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm. Il valore di *cut-off* è 300 O.D.

B.2.8 ELISA per la ricerca degli anticorpi per MG e MS

Per la ricerca di anticorpi nei riguardi di MG e MS è stato utilizzato il kit commerciale FlockChek *Mycoplasma Gallisepticum* e *Mycoplasma Synoviae* Antibody Test Kit (IDEXX LABORATORIES, USA). Nella esecuzione del test sono state seguite le istruzioni della casa produttrice. I valori in densità ottica sono stati misurati con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm. Il valore di *cut-off* è 0,50 in S/P ratio.

B.2.9 Esami batteriologici per *E. coli*

B.2.9.1 Prelievo da campioni d'organo ed essudati

Il prelievo veniva eseguito con tampone sterile o ansa monouso. Per prelievi da organo si eseguiva una preliminare sterilizzazione mediante flambatura della superficie.

B.2.9.2 Semina, isolamento e tipizzazione di *E. coli*

E. coli è in grado di crescere bene su terreni di crescita generale, quali l'agar sangue, ma per il primo isolamento è opportuno abbinare l'impiego di terreni selettivi e differenziali. I terreni Eosin Methylene Blue (EMB-Levine) e MacConkey sono sufficientemente selettivi e differenziali a questo scopo.

Nello studio, il terreno EMB (OXOID,UK) è stato utilizzato in abbinamento al terreno agar sangue (5 % di sangue di montone), che è anche in grado di differenziare ceppi di *E. coli* emolitici. *E. coli* su terreno EMB cresce sottoforma di colonie verdi metalliche (ceppi lattosio positivi) o di colore rosa (ceppi lattosio negativi). Dopo la semina dei campioni, i terreni sono stati incubati 24 ore in aerobiosi a 37 °C. Dopo incubazione le colonie sospette sono state prelevate per l'inoculo in terreno di identificazione delle *Enterobacteriaceae*, Triple Sugar Iron (TSI) agar (OXOID). Dalle colonie cresciute su TSI sono stati preparati strisci su vetrino per la colorazione di Gram ed il test dell'ossidasi. *E. coli* è ossidasi negativo e morfologicamente appare come bacillo Gram negativo. Su TSI agar produce una reazione acida/acida (becco/fondo di colore giallo), con presenza di gas ma non di idrogeno solforato (H₂S). La conferma definitiva dell'identificazione è stata ottenuta mediante galleria biochimica miniaturizzata Rapid ID 32 E (Biomérieux, Francia).

Per la conservazione, tutti gli isolati di *E. coli* sono stati inoculati in provette dedicate (Microbank PRO-LAB DIAGNOSTICS, Canada) e mantenuti in congelatore a -70 °C.

B.2.9.3 Tipizzazione sierologica di *E. coli*

Dopo isolamento, tutti gli *E. coli* sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica mediante tecnica di agglutinazione rapida su vetrino con antisieri O1:K1, O2:K:1, O78:K80 (Veterinary Laboratories Agency, Weybridge,UK). Se non tipizzabili con questi antisieri, i ceppi sono stati inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, per tipizzazione secondo il metodo descritto da Blanco e Blanco (1993), che permette l'identificazione dei seguenti 37 antigeni somatici O: O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O73, O75, O78, O83, O86, O88, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157.

B.3 Risultati

B.3.1 CICLO I

B.3.1.1 Sintomatologia clinica, mortalità e lesioni necroscopiche

Le percentuali di mortalità settimanale sono riportate in tabella B.1 e nella figura B.3. La più elevata mortalità è stata raggiunta alla 4^a settimana con valori dello 0,53%. Gli animali mostravano sintomatologia respiratoria caratterizzata da congiuntivite schiumosa, scolo nasale inizialmente sieroso poi catarrale e rigonfiamento dei seni infraorbitali (figura B.1), starnuti, rantoli tracheali, lieve inappetenza e depressione del sensorio. Alla necropsia si evidenziavano lesioni riferibili a sinusite e colisetticemia (figura B.2).



Figura B.1: Rigonfiamento dei seni infraorbitali.



Figura B.2: Pericardite fibrinosa.

Nelle settimane successive la percentuale di mortalità riferibile a colisetticemia si manteneva bassa non superando lo 0,6%. Alla 14^a settimana erano presenti soggetti con problemi di deambulazione dovuti ad artrotenosinoviti siero-catarrali e fibrinose.

B.3.1.2 RT nested-PCR per AMPV, isolamento e differenziazione dei ceppi vaccinali

I tamponi rino-faringei sono risultati positivi per AMPV sottotipo B alla 4^a settimana di vita. Il virus è stato isolato e tipizzato come ceppo di campo mediante RFLP (tabella B.1 e figura B.3).

B.3.1.3 PCR per HEV

Sono risultati positivi alla PCR per HEV i tamponi cloacali prelevati a 9 settimane e le milze marmorizzate prelevate a 10, 11, 12 e 14 settimane (tabella B.1 e figura B.3).

Tabella B.1: Presenza di forma respiratoria, mortalità % settimanale, PCR-RFLP per AMPV B, isolamento di AMPV e PCR per HEV.

Età (settimana)	Mortalità %	AMPV B PCR-RFLP	HEV cloaca	HEV milza
1	0	/	/	/
2	0	neg	neg	/
3	0,15	neg	neg	/
4	0,53*	campo§	neg	/
5	0,04	neg	neg	neg
6	0	neg	neg	/
7	0	neg	neg	/
8	0	neg	neg	/
9	0,06	neg	pos	neg
10	0,04	neg	neg	pos
11	0,04	neg	neg	pos
12	0,04	neg	neg	pos
13	0	neg	neg	neg
14	0,02	neg	neg	pos

Legenda: * presenza di forma respiratoria; § isolamento virale AMPV; / non eseguito; campo: AMPV ceppo di campo.

B.3.1.4 ELISA per HEV, AMPV, MG e MS

Il titolo anticorpale nei riguardi di AMPV cresce a partire dalla 5^a settimana di vita, presenta un primo picco alla 6^a e 7^a ed un secondo dalla 12^a alla 14^a, che coincide con un rialzo anticorpale per HEV (figura B.3).

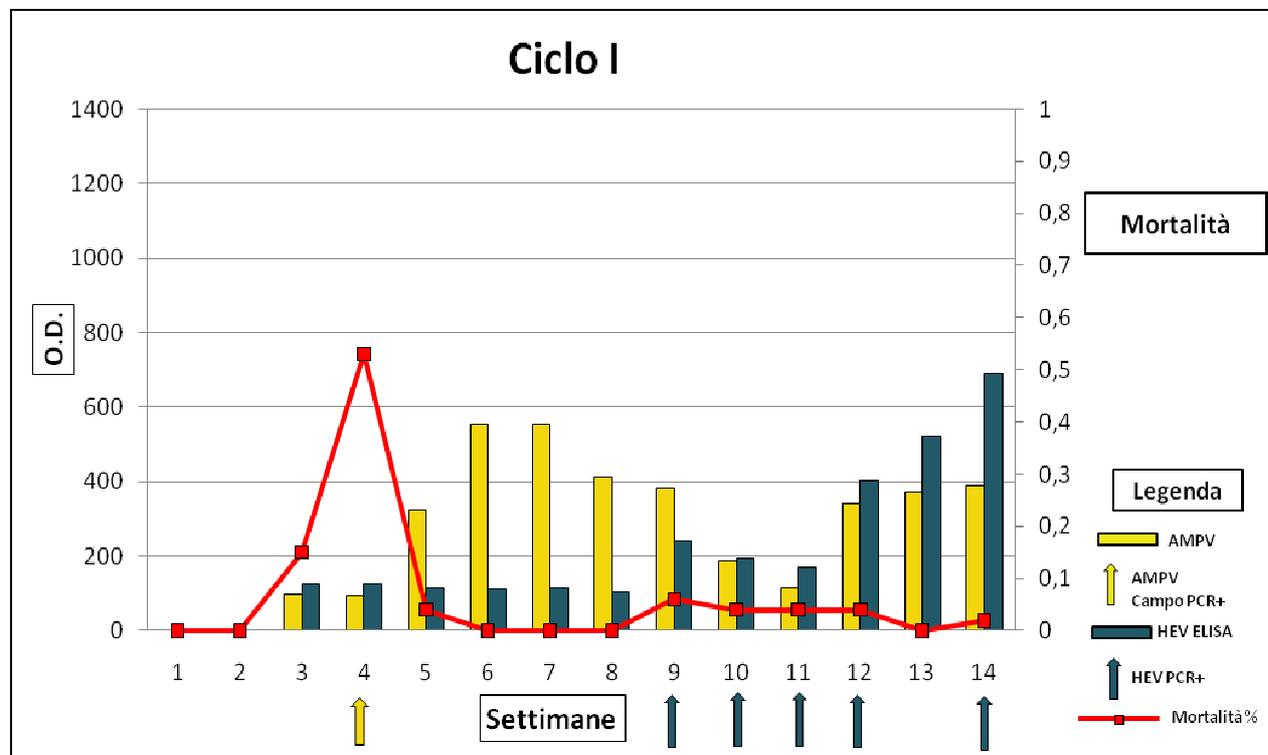


Figura B.3. Andamento della risposta anticorpale per AMPV ed HEV nel Ciclo I (titoli espressi in O.D.). Mortalità percentuale da colisetticemia e tempistica positività in PCR per AMPV B di campo e per HEV.

Nota: Nelle settimane 1 e 2 non sono stati eseguiti prelievi.

Gli esami sierologici per MG ed MS sono risultati tutti negativi.

B.3.1.5 Isolamento e sierotipizzazione di *E. coli*

A partire dalla 3^a settimana sino alla fine dello studio sono stati isolati, da diverse matrici organiche, 13 ceppi di *E. coli*, tutti non emolitici e lattosio fermentanti, ad eccezione di uno. Otto ceppi appartenevano al sierotipo O78, uno al sierotipo O111 (lattosio negativo), mentre 4 non erano tipizzabili (tabella B.2).

Tabella B.2: Identificazione, età degli animali, organo di isolamento, sierotipo e fermentazione del lattosio dei ceppi di *E. coli* del Ciclo I.

Ceppo <i>E.coli</i>	Età (Settimana)	Sierotipo	Organo	Lattosio
13432-1	3	O78	cervello	pos
14359-1	4	O78	pericardio	pos
14359-2	4	O78	pericardio	pos
14359-3	4	NT	pericardio	pos
14359-4	4	NT	pericardio	pos
14964-1	5	O78	pericardio	pos
17421-1	9	NT	cervello	pos
18041-1	10	NT	fegato	pos
18456-1	11	O78	cervello	pos
19038-1	12	O111	polmone	neg
19700-1	13	O78	cervello	pos
20317-1	14	O78	pericardio	pos
20318-1	14	O78	art.tibiotarsica	pos

Legenda: NT: non tipizzabile; art: articolazione.

B.3.2 CICLO II

B.3.2.1 Sintomatologia clinica, mortalità e lesioni necroscopiche

Alla 12^a settimana è stata registrata la mortalità settimanale più elevata, pari allo 0,68% (figura B.5 e tabella B.3). Gli animali presentavano sintomatologia respiratoria analoga a quella osservata nel ciclo precedente (B.3.1.1). Alla necropsia erano presenti chiare lesioni di colisetticemia.

Nelle restanti settimane la mortalità da colibacillosi non ha superato lo 0,11%. Dalla 13^a alla 14^a settimana erano presenti soggetti con artrotenosinovite delle articolazioni coxo-femorale e tibiotarso-tarsometatarsica. All'apertura delle articolazioni era presente essudato sierofibrinoso (figura B.4) con erosioni della testa del femore nella articolazione coxo-femorale.



Figura B.4: Artrotenosinovite sierofibrinosa.

B.3.2.2 RT nested-PCR per AMPV, isolamento e differenziazione dei ceppi vaccinali

I tamponi rino-faringei sono risultati positivi per AMPV sottotipo B alla 5^a e dalla 9^a alla 11^a settimana. Il ceppo isolato in 5^a settimana è risultato essere di origine vaccinale mentre i restanti ceppi erano di campo (tabella B.3 e figura B.5).

B.3.2.3 PCR per HEV

I tamponi cloacali sono risultati continuativamente positivi per HEV dalla 9^a settimana sino a fine indagine, analogamente alle milze marmorizzate prelevate in corso di necroscopie (tabella B.3 e figura B.5).

Tabella B.3: Presenza di forma respiratoria, mortalità % settimanale, PCR-RFLP per AMPV B, isolamento di AMPV e PCR per HEV.

Età (Settimana)	Mortalità %	AMPV B PCR-RFLP	HEV cloaca	HEV milza
1	0	/	/	/
2	0,11	neg	neg	/
3	0,02	neg	neg	/
4	0,04	neg	neg	/
5	0,04	vacc§	neg	/
6	0	neg	neg	neg
7	0	neg	neg	neg
8	0	neg	neg	neg
9	0,02*	campo§	pos	pos
10	0,11*	campo§	pos	pos
11	0,02*	campo§	pos	pos
12	0,68	neg	pos	/
13	0	neg	pos	pos
14	0	neg	pos	pos

Legenda: * presenza di forma respiratoria; § isolamento virale AMPV; / non eseguito; vacc: AMPV ceppo vaccinale; campo: AMPV ceppo di campo.

B.3.2.4 ELISA per HEV, AMPV, MG e MS

Nel secondo ciclo è stato evidenziato un marcato rialzo anticorpale per HEV alla 10^a settimana, che si è protratto sino a fine studio decrescendo lievemente. Gli anticorpi nei riguardi di AMPV sono comparsi successivamente (12^a-14^a settimana) (figura B.5).

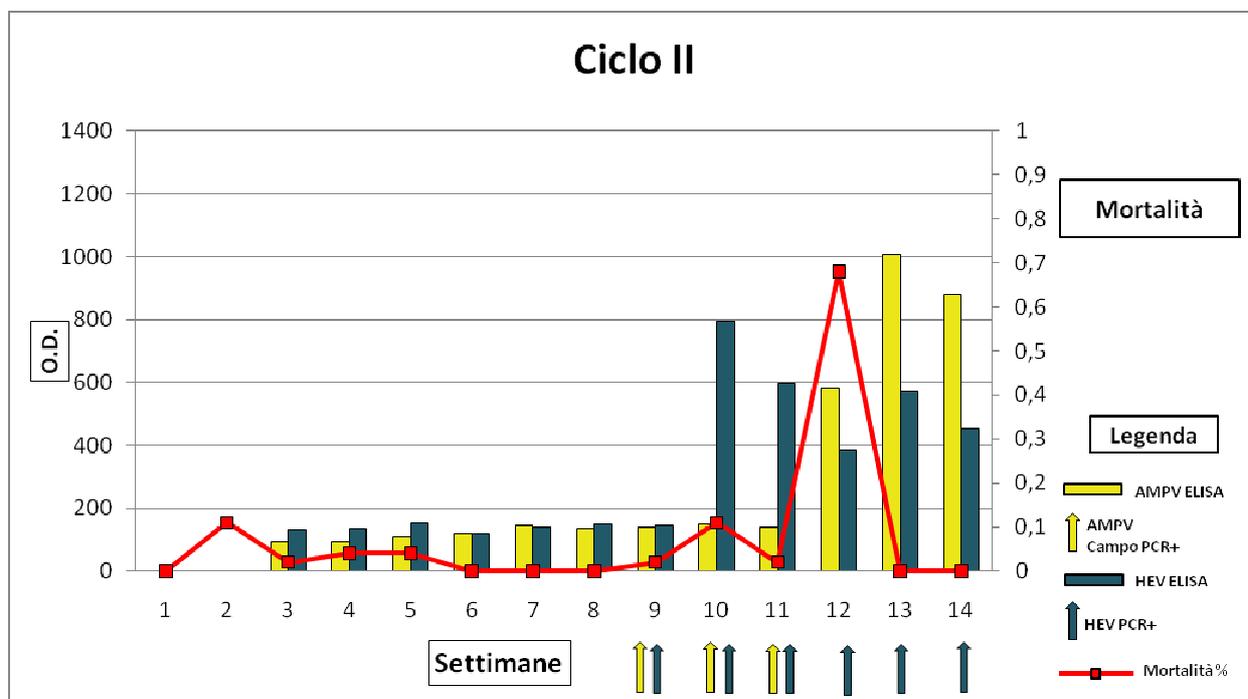


Figura B.5: Andamento della risposta anticorpale per AMPV ed HEV nel Ciclo II (titoli espressi in O.D.). Mortalità percentuale da colisetticemia e tempistica positività in PCR per AMPV B di campo e per HEV.
Nota: Nelle settimane 1 e 2 non sono stati eseguiti prelievi.

Gli esami sierologici per MG ed MS sono risultati tutti negativi.

B.3.2.5 Isolamento e sierotipizzazione di *E. coli*

Sono stati isolati 23 ceppi di *E. coli*, tutti non emolitici e lattosio fermentanti ad eccezione di uno. Diciotto ceppi appartenevano al sierotipo O78, 4 al sierotipo O2, mentre un ceppo non era tipizzabile (tabella B.4).

Tabella B.4: Identificazione, età degli animali, organo di isolamento, sierotipo e fermentazione del lattosio dei ceppi di *E. coli* del Ciclo II.

Ceppo <i>E. coli</i>	Età (Settimana)	Sierotipo	Organo	Lattosio
27028-1	2	O2	cervello	pos
27619-1	3	O2	cervello	pos
27620-1	3	O2	cervello	pos
28234-1	3	O2	pericardio	pos
29610-1	5	O78	cervello	pos
29610-3	5	O78	cervello	neg
29611-1	3	O78	cervello	pos
410-1	9	O78	cervello	pos
1037-1	10	O78	cervello	pos
1037-2	10	O78	cervello	pos
1038-2	10	O78	cervello	pos
1038-3	10	O78	cervello	pos
1038-4	10	O78	polmone	pos
2216-1	12	NT	polmone	pos
2497-1	12	O78	polmone	pos
2497-2	12	O78	polmone	pos
2497-3	12	O78	polmone	pos
2759-1	12	O78	art.coxof.	pos
3302-1	14	O78	art.coxof.	pos
3302-1	14	O78	art.tibiot.	pos
3302-4	14	O78	art.coxof.	pos
3302-4	14	O78	art.tibiot. 1	pos
3302-4	14	O78	art.tibiot. 2	pos

Legenda: NT: non tipizzabile; art.: articolazione; coxofem.: coxofemorale; tibiot.: tibiotarsica.

B.3.3 CICLO III

B.3.3.1 Sintomatologia clinica, mortalità e lesioni necroscopiche

La più elevata mortalità settimanale (0,42%) è stata riscontrata alla 10^a settimana, in aumento dopo la 9^a (0,18%) (tabella B.5 e figura B.6). Come anche già evidenziato nei cicli precedenti, in queste settimane i tacchini mostravano sintomatologia respiratoria seguita a breve da mortalità dovuta a lesioni riferibili a colisetticemia. A differenza dei due studi precedenti, in questo non è stato rilevato nessun episodio di zoppia.

B.3.3.2 RT nested-PCR per AMPV e differenziazione dei ceppi vaccinali

Anche in questo ciclo il sottotipo B di AMPV è stato l'unico evidenziato. Ceppi di origine vaccinale circolavano nella 3^a e nella 4^a settimana, mentre il ceppo di campo è comparso nella 10^a (tabella B.5 e figura B.6).

B.3.3.3 PCR per HEV

HEV è comparso nel gruppo alla 9^a settimana e continuava ad essere evidenziato nei tamponi cloacali sino alla 13^a (tabella B.5 e figura B.6).

Tabella B.5: Presenza di forma respiratoria, mortalità % settimanale, PCR-RFLP per AMPV B e PCR per HEV.

Età (Settimana)	Mortalità %	AMPV B PCR-RFLP	HEV cloaca	HEV milza
1	0	/	/	/
2	0	neg	neg	/
3	0	vacc	neg	/
4	0	vacc	neg	/
5	0	neg	neg	/
6	0,04	neg	neg	/
7	0,02	neg	neg	/
8	0	neg	neg	/
9	0,18*	neg	pos	/
10	0,42*	campo	pos	/
11	0	neg	pos	/
12	0	neg	pos	/
13	0	neg	pos	/
14	0	neg	neg	/

Legenda: * presenza di forma respiratoria; / non eseguito; vacc: AMPV ceppo vaccinale; campo: AMPV ceppo di campo.

B.3.3.4 ELISA per HEV, AMPV, MG e MS

Nel terzo ciclo si osserva un rialzo del titolo anticorpale per AMPV dalla 11^o settimana fine al termine dello studio. I titoli anticorpali HEV superavano lievemente il *cut-off* alla 10^a settimana e, senza mai raggiungere un picco, rimanevano tali sino al termine dello studio (figura B.6).

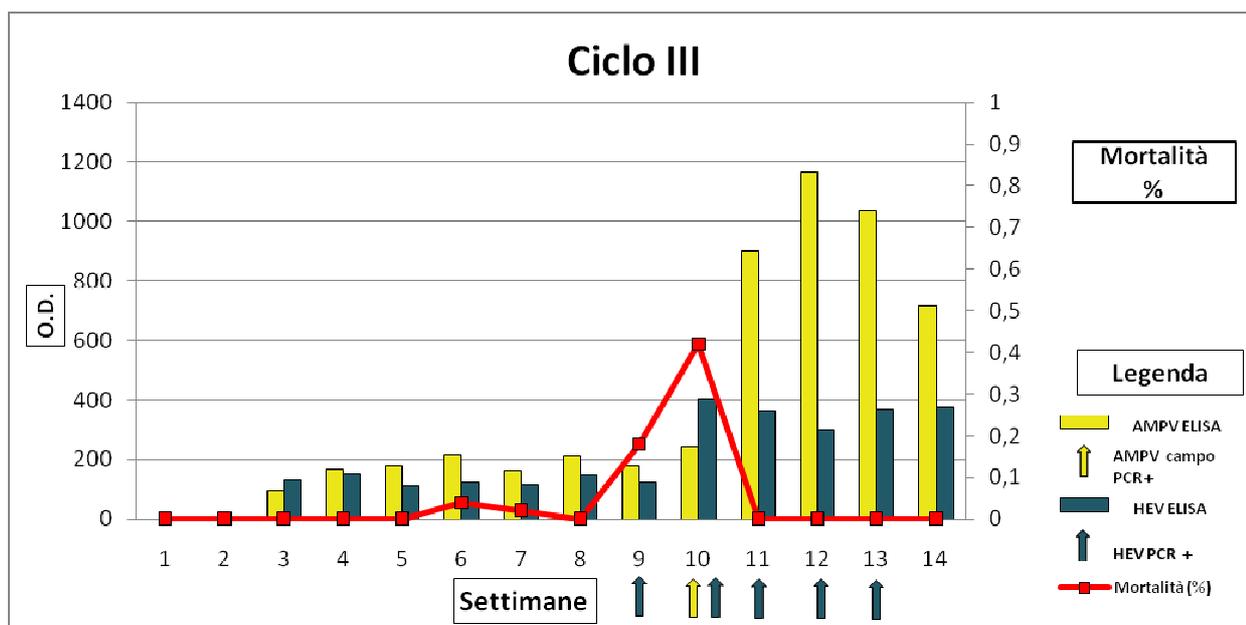


Figura B.6. Andamento della risposta anticorpale per AMPV ed HEV nel Ciclo III (titoli espressi in O.D.). Mortalità percentuale da colisetticemia e tempistica positività in PCR per AMPV B di campo e per HEV.
Nota: Nelle settimane 1 e 2 non sono stati eseguiti prelievi.

Nessuna produzione anticorpale era rilevabile per MG e MS.

B.3.3.5 Isolamento e sierotipizzazione di *E. coli*

Sono stati isolati 10 ceppi di *E. coli* non emolitici, catalasi positivi e lattosio positivi. Tutti gli isolati, esclusi due che risultavano non tipizzabili, appartenevano al sierotipo O2 (tabella B.6).

Tabella B.6. Identificazione, età degli animali, organo di isolamento, sierotipo e fermentazione del lattosio dei ceppi di *E. coli* del Ciclo III.

Ceppo <i>E. coli</i>	Età (Settimana)	Sierotipo	Organo	Lattosio
12685-1	6	O2	pericardio	pos
12685-2	6	O2	cervello	pos
13282-1	8	O2	cervello	pos
14486-1	9	O2	cervello	pos
14486-2	9	O2	cervello	pos
14486-1	9	NT	polmone	pos
14486-2	9	NT	polmone	pos
15189-1	10	O2	cervello	pos
15189-2	10	O2	cervello	pos
15189-3	10	O2	cervello	pos

Legenda: NT: non tipizzabile.

B.4 Discussione

Le indagini svolte hanno fornito importanti informazioni sull'epidemiologia delle infezioni da AMPV, HEV ed *E. coli*, indicando che la mortalità più elevata da colibacillosi si evidenziava sempre a seguito di infezione virale, anche se con tempistica differente nei vari studi.

L'infezione, sia precoce che tardiva, da ceppi di campo di AMPV sottotipo B, ha predisposto alla colibacillosi in tutti e tre gli studi longitudinali. Gli animali, pur vaccinati per AMPV sottotipo B, si sono dimostrati suscettibili, a diverse età, all'infezione con il virus di campo omologo. Questa incompleta protezione vaccinale è stata studiata recentemente. Cecchinato *et al.* (2010) hanno evidenziato che i ceppi di AMPV sottotipo B attualmente circolanti nel nostro Paese sono mutati in regioni genomiche codificanti per epitopi antigenici chiave della proteina di superficie G, mentre Catelli *et al.* (2010) hanno dimostrato

sperimentalmente che tali mutazioni rendono tali ceppi in grado di eludere l'immunità conferita da un vaccino dello stesso sottotipo in commercio nel nostro Paese.

Gli stessi Autori hanno riportato che la maggior parte delle infezioni da AMPV sottotipo B, a seguito di vaccinazione omologa, sono tardive, comprese tra la 6^a e la 13^a settimana di vita. Questa situazione si è verificata anche nei cicli II e III, ma non nel primo, dove AMPV è stato isolato a 4 settimane. Nei cicli successivi si evidenzia un'infezione tardiva da AMPV abbinata ad una prolungata presenza di HEV (documentata dalla positività dei *pool* cloacali e/o di milze) a partire dalla 9^a settimana fino al termine di entrambi gli studi longitudinali. In particolare, nel ciclo II, la mortalità più elevata da colisetticemia, alla 12^a settimana, si riscontrava dopo contemporanea circolazione virale di AMPV ed HEV per tre settimane. Appare evidente come l'azione combinata di HEV ed AMPV, il primo a livello intestinale e del sistema immunitario, il secondo a livello respiratorio, abbia predisposto l'infezione da *E. coli*. L'infezione da parte di entrambi i virus è sempre documentata da un elevato incremento anticorpale, che non è mai presente a seguito di vaccinazione come dimostrato nello studio pilota. Poiché gli esami sierologici per i micoplasmi sono risultati sempre negativi, essi possono essere esclusi, in questi studi, quali fattori “*door opener*” la colibacillosi.

Il ben documentato ruolo immunosoppressivo da HEV (Rautenschlein e Sharma, 2000) sembra, ad una osservazione dei dati ottenuti nei tre studi longitudinali I, II e III, da considerarsi significativo solo in abbinamento ad AMPV. Anche Ceruti *et al.* (2007) hanno riportato una situazione analoga in riproduttori di tacchini con mortalità da colibacillosi preceduta da forma respiratoria di AMPV ed infezione da HEV.

La situazione di epidemia di AMPV in Italia difficilmente permette di studiare il ruolo di HEV come fattore unico predisponente alla colibacillosi. Tale possibilità è stata ampiamente riportata negli Stati Uniti dove sono stati osservati episodi di mortalità da colibacillosi predisposti solamente da infezione HEV (Sponenberg *et al.*, 1985).

Studio C

EPIDEMIOLOGIA DEGLI APEC NEL TACCHINO DA CARNE

C.1 Introduzione

In questa parte dell'indagine sono stati presi in considerazione i ceppi APEC isolati nello studio B, e precedentemente sierotipizzati, valutandone l'epidemiologia nei tre cicli produttivi oggetto d'indagine. I ceppi sono stati classificati per antibiotico-sensibilità (resistotipo), diversità genetica, valutata utilizzando *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR), e potenziale patogeno mediante ricerca dei geni di virulenza (patotipo).

C.2 Materiali e metodi

C.2.1 Ceppi batterici

Sono stati analizzati 46 ceppi di *E. coli* isolati durante i 3 studi longitudinali eseguiti e riportati nello studio B.

In particolare i ceppi erano così distribuiti:

- Ciclo I: 8 ceppi sierotipo O78, 1 ceppo sierotipo O111, 4 ceppi non tipizzabili;
- Ciclo II: 18 ceppi sierotipo O78, 4 ceppi sierotipo O2, 1 ceppo non tipizzabile;
- Ciclo III: 8 ceppi sierotipo O2, 2 ceppi non tipizzabili.

C.2.2 Analisi della sensibilità agli antibiotici (resistotipo) con test di Kirby-Bauer

Per la valutazione della resistenza a specifici antibiotici e l'individuazione del resistotipo è stato utilizzato il test di Kirby-Bauer.

Per l'esecuzione dell'antibiogramma è stato utilizzato il Mueller-Hinton Agar (OXOID, UK) in piastre da 90 mm. L'inoculo batterico è stato preparato sospendendo 4-5 colonie batteriche, coltivate sul terreno primario d'isolamento, in 4-5 ml di Mueller-Hinton brodo (OXOID), quindi

incubato per 6 ore fino a che la brodocoltura raggiungeva la stessa densità dello standard di opacità corrispondente a 0,5 della scala McFarland. Successivamente, 0,5 ml di brodocoltura sono stati seminati sulla superficie di una piastra di Mueller-Hinton agar, sulla quale sono stati poi depositati 9 dischetti di antibiotici posizionati ad una distanza appropriata utilizzando un apposito distributore. I principi attivi degli antibiotici utilizzati in questa prova sono: colistina, apramicina, gentamicina, amoxicillina, ampicillina, trimethoprim-sulfametossazolo, enrofloxacin e ossitetraciclina. La piastra è stata incubata in termostato a 37° C per 24 ore, dopodiché si è proceduto alla lettura del diametro degli aloni di inibizione in millimetri. La sensibilità dei microrganismi alla colistina, alla gentamicina, all'amoxicillina, all'ampicillina, al trimethoprim-sulfametossazolo e all'ossitetraciclina è stata valutata sulla base dei *breakpoint* indicati nel manuale OXOID (1993). Per l'interpretazione degli aloni d'inibizione relativi all'enrofloxacin, invece, sono state seguite le indicazioni del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2004), mentre per l'apramicina e l'aminosidina si è ricorsi a quelle fornite dalle case farmaceutiche (rispettivamente *Elanco Lilly Animal Health USA*, e *Pzifer Animal Health USA*). Per ogni antibiotico è stato determinato se il ceppo di *E. coli* era :

- Completamente resistente (R);
- Intermedio resistente (I);
- Sensibile cioè privo di resistenza antibiotica (S).

Il resistotipo di ogni ceppo di *E. coli* (definito dalla combinazione dei risultati R, I o S per ciascun antibiotico testato) è stato identificato con una lettera maiuscola.

C.2.3 PCR per l'amplificazione dei geni di virulenza di *E. coli* (patotipo): *iucD*, *tsh*, *papC*, *fimC*, *fyuA* e *irp-2*

La PCR è stata utilizzata per amplificare i seguenti geni di virulenza: *iucD*, *tsh*, *fimC*, *fyuA*, *irp-2*, *papC* (Janben *et al.*, 2001; Gophna *et al.*, 2001). La presenza di uno o più di questi geni identifica il patotipo (potenziale di patogenicità) di *E. coli* e permette di includere i microrganismi fra i cosiddetti *Avian Pathogenic Escherichia Coli* (APEC). Janben *et al.* (2001) ritengono che 5 dei geni qui ricercati (*iucD*, *tsh*, *fimC*, *fyuA*, *irp-2*) siano presenti in alta percentuale nei ceppi APEC particolarmente virulenti. Il patotipo di ogni ceppo di *E. coli* è stato identificato con una lettera maiuscola.

I ceppi batterici per l'analisi PCR sono stati precedentemente inoculati in EC brodo (OXOID), incubati in condizioni di aerobiosi a 37 °C per 12 ore. Il DNA batterico è stato estratto con Prepman Ultra (Applied Biosystem, USA). L'amplificazione dei geni di virulenza: *iucD*, *tsh*, *papC*, *fimC* (JanBen *et al.*, 2001), *fyuA* e *irp-2* (Gophna *et al.*, 2001), è stata eseguita con il

kit PCR Qiagen Multiplex (Qiagen, Germania). Gli ampliconi sono stati analizzati con elettroforesi capillare sul QIAxcel system (Qiagen) utilizzando il metodo AH420 e l'Alignment Marker 50 bp/3 kb. I risultati sono stati elaborati col software dal QIAxcel Biocalculator (Qiagen).

C.2.4 RAPD-PCR

La RAPD-PCR è una tecnica di tipizzazione genetica più rapida ed economica rispetto ad altre metodologie quali la RFLP. Essa è in grado di evidenziare similarità genomica tra i ceppi APEC isolati classificandoli in RAPD-tipo (Maurer *et al.*, 1998a; Chansiripornchai *et al.*, 2001). I ceppi con elevata omologia molecolare sono inclusi all'interno dello stesso *cluster*.

Il DNA batterico è stato estratto con Prepman Ultra e quantificato allo spettrofotometro per ottenere un concentrazione finale di 4 ng/ul. Venti ng di DNA sono stati utilizzati come template per la RAPD-PCR eseguita col *primer* 1290 (Maurer *et al.*, 1998a) e il kit Ready-to-Go beads (GE Healthcare, USA) seguendo la procedura riportata dal produttore. Il ciclo termico utilizzato è il seguente: 5 minuti a 95 °C, 45 cicli di 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 36 °C e 2 minuti a 72 °C. I prodotti di amplificazione sono stati separati con elettroforesi su un gel al 2% di agarosio colorato con SYBR safe (Invitrogen, USA).

L'immagine del gel è stata acquisita con Gel Doc 2000 (Bio-Rad, USA) e il *fingerprinting* è stato analizzato con software GelCompar II (versione 2.0, Applied Maths, Belgio). Il programma GelCompar II analizza i profili elettroforetici e attraverso la costruzione di una matrice, calcola il livello di similarità tra profili e crea un dendrogramma. Nella costruzione della matrice è stato utilizzato il coefficiente di similarità di Pearson che considera sia la posizione delle bande elettroforetica sia la sua intensità. Nella costruzione del dendrogramma, determinato con il metodo di associazione UPGMA (*unweighed pair group method with arithmetic average*) i valori dei parametri "ottimizzazione" e "tolleranza", che determinano il grado minimo di variabilità di un profilo rispetto a quello più simile, sono stati scelti in modo automatico dal software. Al fine di testare la robustezza e la riproducibilità della tecnica RAPD, l'analisi è stata ripetuta due volte, ottenendo gli stessi risultati.

C.3 Risultati

C.3.1 CICLO I

C.3.1.1 Resistotipo

Come evidenziato nella tabella C.1, tutti i ceppi di *E. coli* O78 isolati nel Ciclo I possedevano lo stesso resistotipo (A). *E. coli* O111 è risultato sensibile a tutti gli antibiotici testati ad eccezione dell'ossitetraciclina ed enrofloxacin (resistotipo E). I ceppi non tipizzabili hanno mostrato tre profili diversi (resistotipi B, C, D).

Tabella C.1: Resistotipo dei ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo I.

Ceppo <i>E. coli</i>	Organo	Sierotipo	CT	GM	APR	AMOX AMP	AMN	SXT	ENR	OTC	Resistotipo
13432-1	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
14359-1	pericardio	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
14359-2	pericardio	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
14359-3	pericardio	NT	S	S	S	R	S	R	S	R	B
14359-4	pericardio	NT	S	S	S	R	R	R	S	R	C
14964-1	pericardio	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
17421-1	cervello	NT	S	S	S	S	S	S	S	R	D
18041-1	fegato	NT	S	S	S	R	S	R	S	R	B
18456-1	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
19038-1	polmone	O111	S	S	S	S	S	S	I	R	E
19700-1	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
20317-1	pericardio	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
20318-1	art.tibiotarsica	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A

Legenda: S: sensibile; I: intermedio; R: resistente NT: non tipizzabile; CT: colistina, GM: gentamicina; APR: apramicina; AMOX: amoxicillina; AMP: ampicillina; SXT: trimethoprim-sulfametossazolo; ENR: enrofloxacin; OTC: ossitetraciclina; art: articolazione.

C.3.1.2 Patotipo

I geni di virulenza *iucD*, *tsh*, *fimC*, *irp-2* e *fyuA* sono risultati presenti in tutti i ceppi di *E. coli* O78 (patotipo A). *E. coli* O111 e un ceppo non tipizzabile possedevano tutti i geni di virulenza ricercati (patotipo D) (tabella C.2). Questi ceppi sono da considerarsi APEC sulla base di quanto osservato da Janben *et al.* (2001). I rimanenti tre ceppi di *E. coli*, non tipizzabili nello studio B, avevano un profilo patogenetico differente tra loro (patotipi B, C, E) e non sono considerabili APEC sulla base dei geni di patogenicità valutati nel presente studio.

Tabella C.2: Patotipo dei ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo I.

Ceppo <i>E. coli</i>	Organo	Sierotipo	<i>fimC</i>	<i>irp2</i>	<i>fyuA</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>papC</i>	Patotipo
13432-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
14359-1	pericardio	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
14359-2	pericardio	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
14359-3	pericardio	NT	pos	neg	neg	neg	neg	neg	B
14359-4	pericardio	NT	pos	neg	neg	pos	neg	pos	C
14964-1	pericardio	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
17421-1	cervello	NT	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
18041-1	fegato	NT	neg	neg	neg	neg	neg	neg	E
18456-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
19038-1	polmone	O111	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
19700-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
20317-1	pericardio	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
20318-1	art.tibiotarsica	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A

Legenda: NT: non tipizzabile; art: articolazione.

C.3.1.3 RAPD-PCR

I profili RAPD-PCR degli isolati del Ciclo I hanno permesso di ottenere il dendrogramma riportato in figura C.1. In esso sono stati individuati tre *cluster*. Il *cluster* II consisteva di 7 ceppi *E. coli* O78 che avevano più dell'80% di similarità genomica. Questi ceppi condividevano anche lo stesso resistotipo e lo stesso patotipo.

Figura C.1: Analisi RAPD-PCR su ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo I.



Legenda: Sett.: settimana; NT: non tipizzabile.

C.3.2 CICLO II

C.3.2.1 Resistotipo

Fra gli isolati di *E. coli* del ciclo II, quattro ceppi sierotipo O2 possedevano due diversi profili di resistenza (resistotipi F e G) mentre dei ceppi O78, 11 appartenevano al resistotipo A, 6 al resistotipo I, 1 al resistotipo H (tabella C.3).

Tabella C.3: Resistotipo dei ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo II.

Ceppo <i>E. coli</i>	Organo	Sierotipo	CT	GM	APR	AMOX AMP	AMN	SXT	ENR	OTC	Resistotipo
27028-1	cervello	O2	S	R	S	R	S	S	S	I	F
27619-1	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	G
27620-1	cervello	O2	S	R	S	R	S	S	S	I	F
28234-1	pericardio	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	G
29610-1	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
29610-3	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
29611-1	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
410-1	cervello	O78	S	I	S	R	S	S	R	R	H
1037-1	cervello	O78	S	S	S	R	S	R	I	R	I
1037-2	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
1038-2	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
1038-3	cervello	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
1038-4	polmone	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
2216-1	polmone	NT	S	S	S	R	S	R	I	R	I
2497-1	polmone	O78	S	S	S	R	S	R	I	R	I
2497-2	polmone	O78	S	S	S	R	S	R	I	R	I
2497-3	polmone	O78	S	S	S	R	S	R	I	R	I
2759-1	art.coxof.	O78	S	S	S	R	S	R	I	R	I
3302-1	art.coxof.	O78	S	S	S	R	S	R	I	R	I
3302-1	art.tibiot.	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
3302-4	art.coxof.	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
3302-4	art.tibiot. 1	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A
3302-4	art.tibiot. 2	O78	S	S	S	R	S	S	I	R	A

Legenda: S: sensibile; I: intermedio; R: resistente; NT: non tipizzabile; CT: colistina, GM: gentamicina; APR: apramicina; AMOX: amoxicillina; AMP: ampicillina; SXT: trimethoprim-sulfametossazolo; ENR: enrofloxacin; OTC: ossitettraciclina; art: articolazione; coxof.: coxofemorale; tibiot: tibiotarsica.

C.3.2.2 Patotipo

Tutti gli *E. coli* sierotipo O2 e O78 presentavano i geni di virulenza *iucD*, *tsh*, *fimC*, *irp-2* e *fyuA* (patotipo A) (tabella C.4). Secondo quanto dimostrato da Janben *et al.* (2001) tutti questi ceppi sono da considerare APEC. Tutti i ceppi O78 hanno mostrato patotipo identico a quelli isolati nel primo ciclo (tabella C.2). Il ceppo non tipizzabile aveva un profilo patogenetico differente e non è considerabile APEC sulla base dei geni di patogenicità valutati nel presente studio.

Tabella C.4: Patotipo dei ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo II.

Ceppo <i>E. coli</i>	Organo	Sierotipo	<i>fimC</i>	<i>irp2</i>	<i>fyuA</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>papC</i>	Patotipo
27028-1	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
27619-1	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
27620-1	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
28234-1	pericardio	O2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
29610-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
29610-3	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
29611-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
410-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
1037-1	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
1037-2	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
1038-2	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
1038-3	cervello	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
1038-4	polmone	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
2216-1	polmone	NT	pos	neg	neg	pos	pos	pos	F
2497-1	polmone	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
2497-2	polmone	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
2497-3	polmone	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
2759-1	art.coxofem.	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
3302-1	art.coxof.	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
3302-1	art.tibiot.	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
3302-4	art.coxof.	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
3302-4	art.tibiot. 1	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A
3302-4	art.tibiot. 2	O78	pos	pos	pos	pos	pos	neg	A

Legenda: NT: non tipizzabile; art: articolazione; coxof.: coxofemorale; tibiot.: tibiotarsica.

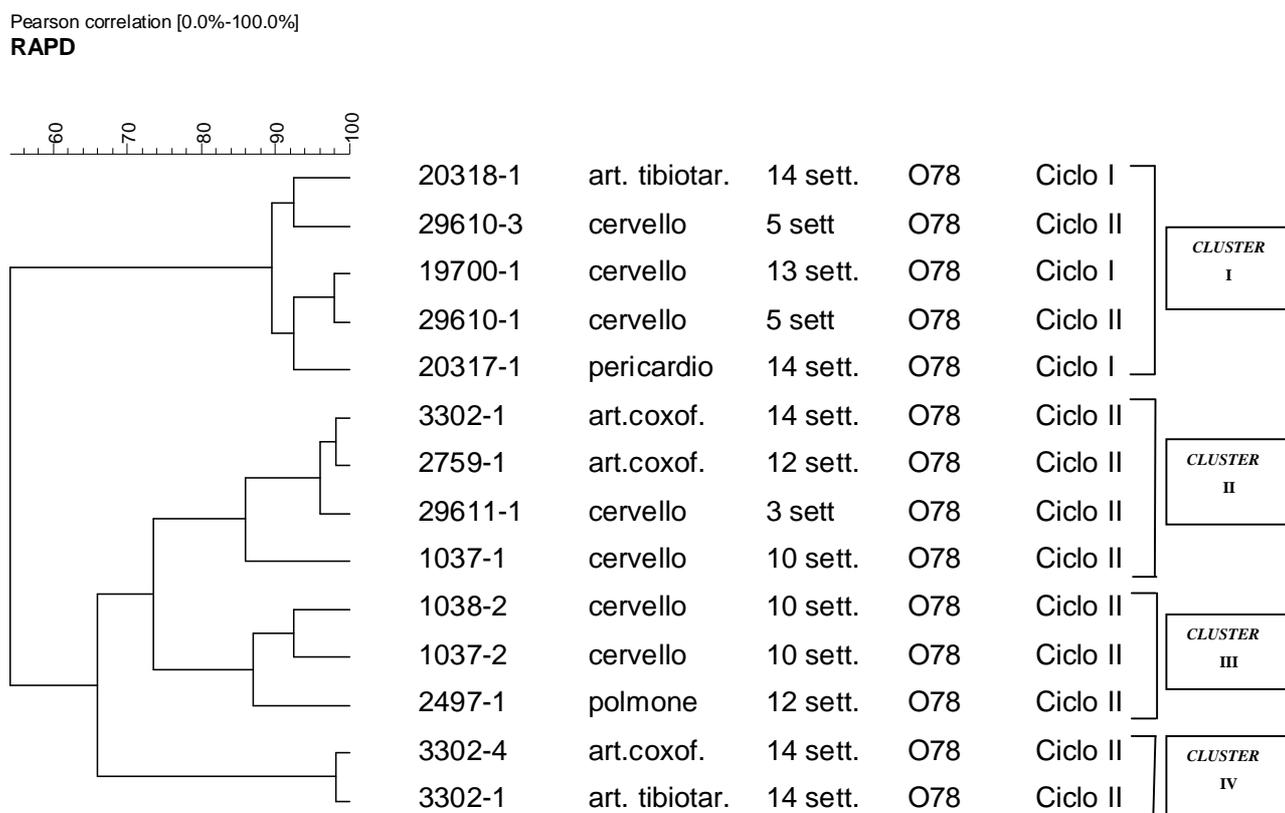
C.3.2.3 RAPD-PCR

Nella figura C.2 è riportato il dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili RAPD-PCR della maggior parte dei ceppi O78 isolati nel Ciclo II, paragonati con tre ceppi O78 isolati nel ciclo precedente, aventi lo stesso resistotipo e patotipo.

Tale dendrogramma evidenzia 4 *cluster* (I, II, III, IV). All'interno di ciascun *cluster* è evidenziabile un'elevata omologia genomica, rispettivamente: 90%, 86%, 87% e 98%.

Il *cluster* I contiene sia alcuni APEC O78 isolati nel Ciclo II sia alcuni del ciclo precedente appartenenti al medesimo sierotipo, patotipo e resistotipo. Il *cluster* II è composto da 4 APEC O78 di cui 2 isolati da cervello e due da articolazioni aventi medesimo patotipo (tabella C.4) ma diverso resistotipo (tabella C.3). Il *cluster* III comprende tre APEC O78, isolati da cervello e polmoni, con medesimo patotipo (tabella C.4) ma appartenenti a due diversi resistotipi (tabella C.3). Nel *cluster* IV sono inclusi solamente due APEC O78, con stesso patotipo e resistotipo (tabelle C.3 e C.4), isolati da articolazioni ma non da visceri.

Figura C.2: Analisi RAPD su ceppi di *E. coli* O78 isolati nei Cicli I e II.



Legenda: art: articolazione; coxof.: coxofemorale, tibiotar: tibiotarsica; sett: settimana.

C.3.3 CICLO III

C. 3.3.1 Resistotipo

Tutti gli *E. coli* O2 isolati durante il Ciclo III presentano lo stesso profilo di resistenza (resistotipo I) (tabella C.5), diverso rispetto a quelli presentati dai ceppi O2 isolati nel ciclo precedente (resistotipi F e G).

Tabella C.5: Resistotipo dei ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo III.

Ceppo <i>E. coli</i>	Organo	Sierotipo	CT	GM	APR	AMOX- AMP	AMN	SXT	ENR	OTC	Resistotipo
12685-1	pericardio	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
12685-2	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
13282-1	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
14486-1	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
14486-2	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
14486-1	polmone	NT	S	S	S	R	S	R	R	R	L
14486-2	polmone	NT	S	S	S	R	S	R	R	R	L
15189-1	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
15189-2	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I
15189-3	cervello	O2	S	S	S	R	S	R	I	R	I

Legenda: S: sensibile; I: intermedio; R: resistente NT: non tipizzabile; CT: colistina, GM: gentamicina; APR: apramicina; AMOX: amoxicillina; AMP: ampicillina; SXT: trimethoprim-sulfametossazolo; ENR: enrofloxacin; OTC: ossitetraciclina.

C. 3.3.2 Patotipo

Gli isolati del Ciclo III, appartenenti tutti al sierotipo O2, possedevano tutti i fattori di virulenza ricercati (patotipo D) (tabella C.6). Il patotipo di questi ceppi è diverso da quello dei ceppi O2 isolati nel ciclo precedente. Allo stesso modo anche questi ceppi sono da considerare APEC secondo quanto evidenziato da Janben *et al.* (2001). Anche in questo ciclo sono stati evidenziati ceppi di *E. coli* non tipizzabili con profilo patogenetico differente dagli O2. Essi non sono stati considerati APEC sulla base dei geni di patogenicità valutati nel presente studio.

Tabella C.6: Patotipo dei ceppi di *E. coli* isolati nel Ciclo III.

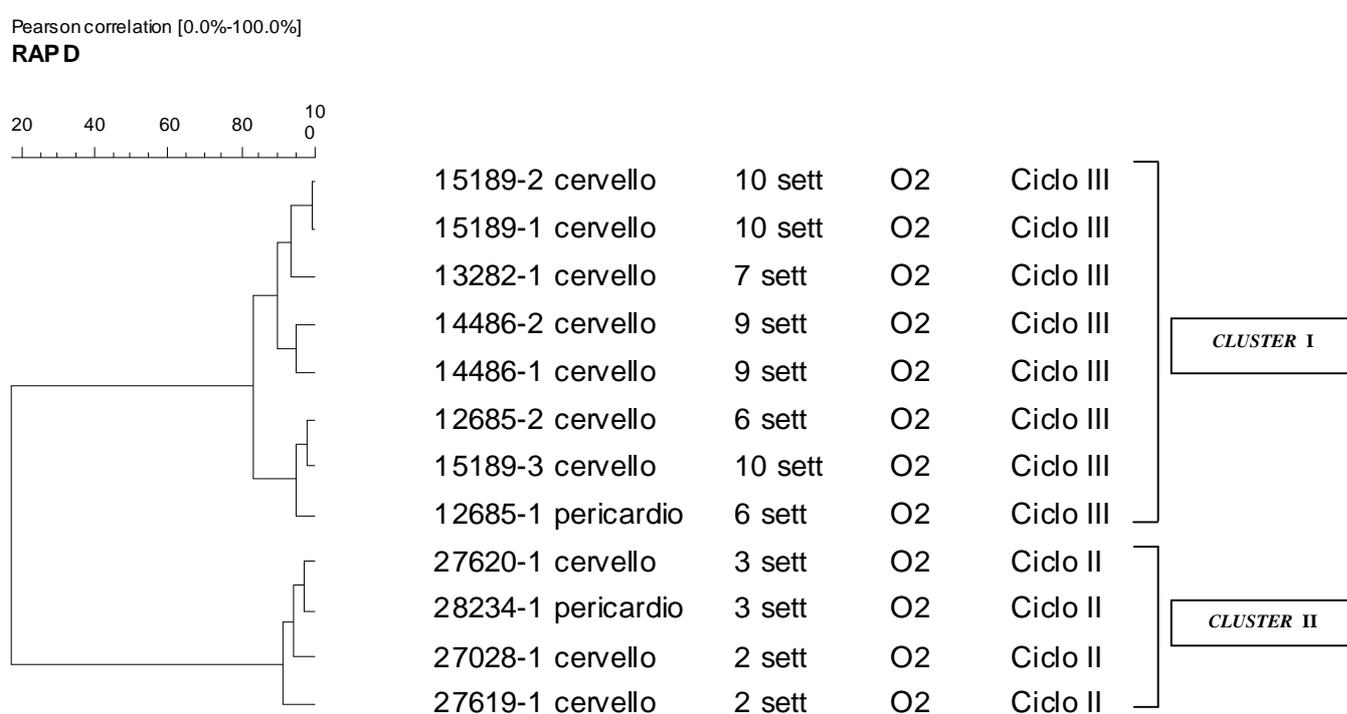
Ceppo <i>E. coli</i>	Organo	Sierotipo	<i>fimC</i>	<i>irp2</i>	<i>fyuA</i>	<i>iucD</i>	<i>tsh</i>	<i>papC</i>	Patotipo
12685-1	pericardio	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
12685-2	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
13282-1	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
14486-1	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
14486-2	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
14486-1	polmone	NT	neg	neg	neg	neg	neg	neg	E
14486-2	polmone	NT	neg	neg	neg	neg	neg	neg	E
15189-1	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
15189-2	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D
15189-3	cervello	O2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	D

Legenda: NT: non tipizzabile.

C.3.3.3 RAPD-PCR

Nella figura C.3 è riportato il dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili RAPD-PCR dei ceppi O2 isolati nel Ciclo III, in paragone con i quattro ceppi O2 isolati nel ciclo precedente. Tale dendrogramma evidenzia 2 *cluster* ben distinti fra loro con omologia del 20%. Il primo *cluster* raggruppa tutti i ceppi isolati nel Ciclo III (omologia >80%), il secondo quelli isolati nel Ciclo II (omologia >90%).

Figura C.3: Analisi RAPD su ceppi di *E. coli* O78 isolati nei Cicli II e III.



Legenda: sett: settimana.

C.4 Discussione

I lavori presenti in letteratura, riguardanti l'epidemiologia di *E. coli* nel pollame, sono stati sino ad ora focalizzati sulla trasmissione di *E. coli* da allevamenti di polli e tacchini riproduttori alla progenie (Rosario *et al.*, 2004; Giovanardi *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006, Giovanardi *et al.*, 2007). Ad oggi, nessuno studio era stato mai realizzato per comprendere l'epidemiologia di questo batterio nel tacchino da carne, in successivi cicli produttivi, dall'arrivo dei tacchinotti in allevamento fino alla loro macellazione. La necessità di approfondire questo argomento, specialmente in questa specie animale, scaturiva dal fatto che i tacchini, permanendo anche fino a 5 mesi in allevamento, possono presentare più episodi di mortalità da colibacillosi durante il ciclo e, come conseguenza, possono necessitare di vari trattamenti antibiotici, a volte eseguiti senza aver avuto l'esito di un antibiogramma oppure facendo fede unicamente su una valutazione di antibiotico-sensibilità di ceppi di *E. coli* isolati precedentemente. Purtroppo il fenomeno dell'antibiotico-resistenza in *E. coli* è molto attuale, vista la comparsa di ceppi multiresistenti anche verso i fluorochinoloni e le cefalosporine di terza generazione (Lutful Kabir, 2010).

Nel corso dei tre cicli produttivi oggetto del presente studio, sono stati identificati cloni APEC con ben 10 resistotipi diversi, spesso coesistenti. La presenza in allevamento di diversi resistotipi ha importanti conseguenze pratiche, poiché complica la scelta dell'antibiotico e rallenta la tempistica dell'intervento terapeutico, in quanto l'antibiogramma può essere disponibile solo dopo 48 ore dalla necropsopia.

I ceppi di *E. coli* più frequentemente isolati durante lo studio appartenevano ai sierotipi O78 ed O2 ed erano definibili APEC in accordo con i criteri di Janben *et al.* (2001). Questi sierotipi sono stati già più volte segnalati in Italia nell'allevamento del tacchino (D'Incau *et al.* 2006; Giovanardi *et al.*, 2007; Circella *et al.*, 2009). Essi erano portatori di 5 o 6 geni di virulenza codificanti per strutture fenotipiche utili a *E. coli* per aderire agli epiteli e sopravvivere nel torrente circolatorio. Anche Circella *et al.* (2009) hanno osservato nei ceppi APEC di tacchino O78 una elevata percentuale di presenza dei geni *tsh*, *irp2*, *iucD*.

I ceppi di *E. coli* non tipizzabili isolati nella presente indagine appartenevano a patotipi diversi ed a volte differenti tra loro e, a parte uno, non erano considerabili APEC sulla base dei geni di patogenicità valutati nel presente studio. Essendo stati isolati anch'essi in corso di colisetticemie, per valutare la loro patogenicità potenziale saranno necessarie ulteriori indagini, che includano altri geni di virulenza,

Il singolo ritrovamento di un *E. coli* sierotipo O111 rappresenta, a nostra conoscenza, il primo isolamento di questo sierotipo in questa specie animale ed in passato è stato riportato da

Zanella *et al.* (2000) e da Trampel *et al.* (2007) in episodi gravi di colibacillosi nelle galline ovaiole.

Oltre che in forme di colisetticemia, ceppi appartenenti al sierotipo O78 erano riscontrati anche in forme articolari in assenza di lesioni generalizzate. Gli animali interessati avevano 13-14 settimane di età ed erano claudicanti. Il tropismo unicamente articolare di alcuni ceppi di APEC O78, geneticamente correlati tra loro, è stato già precedentemente osservato da van de Hurk *et al.* (1994) dopo infezione sperimentale di tacchini per via endovenosa.

Da ultimo, a partire dall'osservazione che alcuni ceppi APEC O78, isolati in cicli consecutivi, appartenevano allo stesso *cluster* RAPD, si può verosimilmente ipotizzare che essi erano persistiti nell'ambiente di allevamento nel periodo interciclo. Ciò si osserva notoriamente per altri patogeni batterici appartenenti alla stessa famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Broennum Pedersen *et al.*, 2008).

DISCUSSIONE GENERALE

E CONCLUSIONI

La colibacillosi rimane attualmente la patologia più diffusa nell'allevamento del tacchino da carne ed è spesso causa di elevata mortalità con perdite economiche notevoli, anche quando gli animali sono allevati in capannoni moderni e con attrezzature all'avanguardia.

La frustrazione causata dall'impossibilità di risolvere la mortalità da colibacillosi solamente con trattamenti antibiotici è stata la motivazione principale ad intraprendere questa ricerca, tesa ad approfondire le cause coinvolte nel determinismo di questa malattia. In particolare ci si è soffermati sul ruolo predisponente alla colibacillosi di due agenti virali endemici nell'allevamento del tacchino in Italia, uno a tropismo respiratorio come il *Metapneumovirus* aviare (AMPV) e uno ad azione immunosoppressiva quale il virus dell'enterite emorragica del tacchino (HEV).

La scelta dell'allevamento nel quale svolgere l'indagine è stata mirata, in quanto era già stato sede di episodi di colibacillosi negli anni precedenti. Inoltre l'allevatore dimostrava competenza ed affidabilità nella conduzione dell'allevamento e piena disponibilità a visite settimanali programmate e al recupero delle carcasse fresche di animali morti per colibacillosi.

I risultati derivati da questo progetto di ricerca sono stati numerosi e complementari tra loro. Nello studio pilota A non è stata rilevata sierconversione al test ELISA a seguito delle vaccinazioni con il vaccino vivo attenuato per AMPV ed il vaccino spento per HEV, comunemente usati nel nostro Paese nel tacchino. Questi dati hanno reso possibile l'interpretazione e la valutazione dei risultati sierologici dei successivi studi longitudinali, nei quali sono stati evidenziati rialzi anticorpali solamente da infezioni con virus di campo AMPV ed HEV.

Il Prof. Sharma J.M. (comunicazione personale), esperto mondiale di immunologia aviare, espresse nel 2008 opinione favorevole circa l'uso del vaccino spento per HEV solo se esso fosse stato in grado di evocare un'evidente risposta sierologica umorale. I risultati ottenuti negli studi A e B di questa tesi evidenziano l'inefficacia di tale vaccino sia ad evocare una risposta anticorpale rilevabile che a proteggere dall'infezione di campo. L'assenza di protezione potrebbe essere riconducibile, fra le varie cause, a scarsa immunogenicità del vaccino o ad insufficiente titolo dell'antigene virale. È bene inoltre ricordare che in altri Paesi, per la profilassi di questa

malattia, vengono utilizzati solo vaccini vivi attenuati che forniscono, contrariamente agli spenti, buoni risultati (Barbour *et al.*, 1993). L'introduzione di analoghi presidi anche nel nostro Paese è fortemente auspicabile.

Lo studio B, svolto con l'obiettivo di evidenziare eventuali correlazioni tra le infezioni virali da AMPV, HEV e gli episodi di colibacillosi, ha sempre mostrato nelle tre indagini longitudinali una chiara compartecipazione di uno o entrambi i virus nel determinismo della mortalità da colibacillosi. Nei tre cicli la presenza di AMPV sottotipo B ha sempre preceduto la forma batterica, sia precocemente, a quattro settimane di vita, che tardivamente a 10-12 settimane. La tempistica della comparsa delle infezioni da AMPV ha confermato, anche per questa forma, una mancata o parziale protezione vaccinale degli animali, probabilmente dovuta ad elusione dell'immunità vaccinale da parte di ceppi AMPV sottotipo B di recente isolamento, evoluti negli ultimi vent'anni per eludere la risposta immunitaria vaccinale (Catelli *et al.*, 2010; Cecchinato *et al.*, 2010). Le infezioni da AMPV tardive, osservate negli ultimi due cicli, potrebbero essere forse controllate con un secondo intervento vaccinale da effettuarsi intorno alla 8^a-9^a settimana di vita. Tuttavia questo intervento innalzerebbe i costi di produzione del tacchino. Le stesse ditte produttrici di vaccini vivi per AMPV consigliano un richiamo a 5-6 settimane d'età, o più richiami, rispettivamente a 3 e a 7-9 settimane d'età, seguiti da una quarta vaccinazione, a 14 settimane, in zone ad alto rischio d'infezione.

Il coinvolgimento di HEV per l'instaurarsi della colibacillosi è stato trascurabile nel Ciclo I mentre è stato determinante, insieme ad AMPV, nei cicli successivi. In questi ultimi è interessante notare la sua puntualità nel comparire a 9 settimane di età e la sua persistenza nel gruppo, in particolare a livello dell'apparato digerente, fino al termine dello studio longitudinale. Il suo effetto immunodepressivo, e di compromissione dell'integrità della mucosa intestinale, ha probabilmente favorito la diffusione batterica dall'intestino al circolo e l'instaurarsi della colibacillosi. Ulteriori indagini sono necessarie per evidenziare se HEV possa da solo predisporre alla colibacillosi, in quanto gli studi longitudinali riportati nella presente tesi non hanno permesso di evidenziare il ruolo predisponente di HEV in assenza di AMPV, a causa dell'endemicità di entrambi i virus nella realtà avicola italiana.

Studi futuri, in condizioni sperimentali, potranno spiegare meglio se AMPV ed HEV agiscano realmente in sinergia in questa azione predisponente alla colibacillosi.

Gli APEC isolati negli episodi di colibacillosi osservati durante la ricerca erano numerosi ed eterogenei, più o meno correlati geneticamente fra loro. I sierotipi maggiormente implicati erano O78 ed O2. Tutti i ceppi, appartenenti a questi due sierotipi, possedevano geni di virulenza in grado di permettere l'adesione all'epitelio tracheale e la sopravvivenza nel torrente circolatorio,

dimostrando di fatto la loro partecipazione attiva agli episodi mortalità dopo la predisposizione virale.

È da sottolineare che solo in presenza di ceppi APEC O78 sono stati riscontrati problemi di deambulazione; sembra quindi che particolari cloni di *E. coli* patogeni possano avere maggiore tropismo articolare rispetto ad altri, come già osservato da van den Hurk *et al.* (1994).

I diversi approcci di tipizzazione dei ceppi APEC, impiegati in questo studio, hanno permesso di osservare che ceppi di *E. coli* patogeni possono permanere nell'ambiente di allevamento durante il periodo interciclo ed infettare i tacchinotti del ciclo successivo. Tale risultato sottolinea l'importanza della pulizia e delle disinfezioni dei capannoni, delle attrezzature e delle aree di servizio a fine ciclo. Le misure igieniche sono inoltre importanti per limitare la contaminazione fecale del guscio delle uova da cova e quindi l'entrata in allevamento di ceppi APEC multiresistenti provenienti da riproduttori infetti.

Si potrebbe agire ancora più a monte nella filiera produttiva attraverso la ricerca batteriologica intestinale di *E. coli* nei riproduttori ad un giorno di età per individuare portatori di ceppi APEC.

La varietà delle metodiche di tipizzazione impiegate nell'indagine ha permesso di caratterizzare accuratamente gli isolati, evidenziando che ceppi appartenenti allo stesso sierotipo possono essere diversi in termini di resistenza agli antibiotici e nel profilo genetico. La sola sierotipizzazione non si può quindi considerare sufficiente per lo svolgimento di indagini epidemiologiche, ma va associata ad altre tecniche di caratterizzazione. Infatti, solo confrontando ed abbinando i risultati di diverse metodiche, in questo studio è stato possibile dimostrare che ceppi differenti di APEC possono coesistere nello stesso ciclo produttivo. Ciò può avere importanti risvolti pratici, ad esempio nella scelta della terapia antibiotica quando sono contemporaneamente presenti ceppi APEC con diverso resistotipo.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Ankari A.R., Bradbury J.M., Naylor C.J., Worthington K.J., Payne-Johnson C., Jones R.C. 2001. *Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with Escherichia coli at different time intervals*. Avian Pathology, **30**: 257-267.
- Altrekruse S.F., Elvinger F., Lee K.Y., Tollefson L.K., Pierson E.W., Eifert J., Sriranganathan N. 2002. *Antimicrobial susceptibilities of Escherichia coli strains from a turkey operation*. Journal of the American Veterinary Medical Association, **221**: 411-416.
- Andral B., Louzis C., Trap D., Newmann J.A, Bennejean G., Gaumont R. 1985. *Respiratory Disease (Rhinotracheitis) in Turkeys in Brittany, France 1981-1982. I. Field Observations and Serology*. Avian Diseases, **29**: 27-34.
- Ardrey W.B., Peterson C.F., Haggart M. 1968. *Experimental colibacillosis and the development of carriers in laying hens*. Avian Diseases, **12**: 505-511.
- Arp L.H., Jensen A.E. 1980. *Piliation, hemagglutination, motility, and generation time of Escherichia coli that are virulent or avirulent of turkeys*. Avian Diseases, **24**: 153-161.
- Arp L.H. 1982. *Effect of passive immunization on phagocytosis of blood-borne Escherichia coli in spleen and liver of turkeys*. American Journal of Veterinary Research, **43**: 1034-1040.
- AAVV. 1993. Manuale OXOID. pp. 373-376.
- AAVV. 2004. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; informational supplement. CLSI/NCCLS document M31-S1*, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, Wayne, PA, USA, pp. 10-16.
- Barbosa T.M., Serra C.R., La Razione R.M., Woodward M.J., Henriques A.O. 2005. *Screening for Bacillus Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract*. Applied and Environmental Microbiology, **71**: 968-978.
- Barbour E.K., Poss P.E., Brinton M.K., Johnson J.B., Nabbut N.H. 1993. *Evaluation of cell culture propagated and in vivo propagated hemorrhagic enteritis vaccines in turkeys*. Veterinary Immunology and Immunopathology, **35**: 375-383.
- Barnes H.J., Nolan L.K., Vaillancourt J.P. 2008. *Colibacillosis*. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (Eds.). Diseases of Poultry, 12th Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp. 691-737.

- Barrow P., Lovell M., Berchieru A. Jr. 1998. *Use of lytic bacteriophage for control of experimental Escherichia coli septicemia and meningitis in chickens and calves*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **5**: 294-298.
- Broennum Pedersen T., Elmerdahl Olsen J., Bisgaard M. 2008. *Persistence of Salmonella Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation*. Avian Pathology, **4**: 421-427
- Bass L., Liebert C.A., Lee M.D., Summers D.G., White D.G., Thayer S.G., Maurer J.J. 1999. *Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance in Avian Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **43**: 2925-2929.
- Baxter-Jones C., Grant M., Jones R.C., Wilding G.P. 1989. *A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus*. Avian Pathology, **18**: 91-98.
- Bayon-Auboyer M-H., Arnauld C., Toquin D., Etteradossi N. 2000. *Nucleotide sequence of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup*. Journal of General Virology, **81**: 2723-2733.
- Bazile-Pham-Khac S., Troung Q.C., Lafont J.P., Gutmann L., Zhou X.Y., Osman M., Moreau N.J. 1996. *Resistance to fluorochinolones in Escherichia coli isolated from poultry*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **40**: 1504-1507.
- Beach N.M. 2006. *Characterization of avirulent turkey hemorrhagic enteritis virus: a study of the molecular basis for variation in virulence and the occurrence of persistent infection*. PhD discussion, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.
- Bennett R.S., McComc B., Shin H.J., Njenga M.K., Nagaraja K.V., Halvorson D.A. 2002. *Detection of avian pneumovirus in wild Canadian geese (Branta canadensis) and blue-winged teal (Anas discoris)*. Avian Diseases, **46**: 1025-1029.
- Bettelheim K.A. 1994. *Biochemical characteristics of Escherichia coli*. In: Gyles C.L. (Ed.). *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-30.
- Blanco J., Blanco M. 1993. *Escherichia coli enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origin humano y bovino*. Servicio de publicaciones Diputacion Provincial San Marcos ed., Lugo, Spagna.
- Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Jansen W.H., Garcia V., Vazquez M.L., Blanco J. 1998. *Serotypes of Escherichia coli isolated from septicemic chickens in Galicia (northwest Spain)*. Veterinary Microbiology, **61**: 229-235.

- Bopp C.A., Brenner F.W., Fields P.I., Wells J.G., Strockbine N.A. 2003. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th Ed., American Society of Microbiology, Washington, DC, USA, pp. 654-671.
- Bouley S., Sellal E., Bollart A., Lemiere S. 2009. *Differentiation of Avian Metapneumovirus (AMPV) subgroup B and live Avian Metapneumovirus homologous chicken vaccine using real-time RT-PCR*. Proceedings of the 16th World Veterinary Poultry Congress, Marrakesh, Morocco, 8-12 novembre, pp. 281.
- Broor S., Bharaj P. 2007. *Avian and Human Metapneumovirus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1102**: 66-85.
- Brussow H. 2005. *Phage therapy: the Escherichia coli experience*. *Microbiology*, **151**: 2133-2140.
- Buys S.B., Du Preez J.K. 1980. *A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus*. *Turkeys*, **28**: 36.
- Buys S.B., Du Preez J.K., Els H.J. 1989. *The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **56**: 87-98.
- Campos T.A., Stehling E.G., Ferreira A., Castro A.F.P., Brocchi M., Silveira W.D. 2005. *Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian Escherichia coli strains*. *Veterinary Microbiology*, **106**: 275-285.
- Canon R.M., Roe R.T. 1982. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. *Australian Bureau of Animal Health*. Canberra, Australian Government Publishing Service, 17.
- Carattoli A. 2001. *Importance of integrons in the diffusion of resistance*. *Veterinary Research*, **32**: 243-259.
- Carattoli A. 2003. *Plasmid-mediated antimicrobial resistance in Salmonella enterica*. *Current Issues Molecular Biology*, **5**: 113-122.
- Catelli E., Cook J.K.A., Chester J., Orbell S.J., Woods M.A., Baxendale W., Huggins M.B. 1998. *The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian Pneumovirus in chickens*. *Avian Pathology*, **27**: 632-640.
- Catelli E., Lavazza A. 2000. *Relazione sullo stato sanitario dell'allevamento avicolo nel 2000*. *La Selezione Veterinaria*, **11**: 963-970.

- Catelli E., De Marco M.A., Delogu M., Terregino C., Guberti V. 2001. *Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants*. *Veterinary Record*, **149**: 56-58.
- Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Matteo P., Ortali G., Franciosi C., De Marco M.A., Naylor C.J. 2004. *Avian Pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey*. *Italian Journal of Animal Science*, **3**(3): 287-292.
- Catelli E., Cecchinato M., Savage C.E., Jones R.C., Naylor C.J. 2006. *Demonstration of loss attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine*. *Vaccine*, **24**: 6476-6482.
- Catelli E., Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Brown P., Naylor C.J. 2010. *Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity*. *Vaccine*. **28**: 916-921.
- Cavalchini G.L. 1983. *Il tacchino, allevamento, incubazione, patologia*. Edizioni Edagricole, Bologna, pp. 37-40.
- Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. 1999. *Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions*. *Avian Pathology*, **28**: 593-605.
- Cecchinato M., Catelli E., Savage C.E., De Matteo P., Faenzi M., Naylor C.J. 2003. *Evidenza di pneumovirus aviare sottotipo A in corso di un focolaio di TRT in tacchini da carne in Italia*. *Large Animal Review*, **9**(6): 121-122.
- Cecchinato M., Catelli E., Savane C., Jones R.C., Naylor C.J. 2004. *Design, validation, and absolute sensitivity of a novel test for the molecular detection of avian pneumovirus*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **16**: 582-585.
- Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Clubbe J., Naylor C.J. 2009. *Evidence of AMPV attachment protein evolution coincident with mass live vaccine introduction in Italy*. *Proceedings of the 6th International Symposium on Avian Corona and Pneumovirus and Complicating Pathogens*, Rauschlolzhausen, Germania, 14-17 giugno, pp. 278-284.
- Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Clubbe J., Battilani M., Naylor C.J. 2010. *Avian Metapneumovirus attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction*. *Veterinary Microbiology*, **146**: 24-34.

- Ceruti R., Della Valentina M., Gavazzi L., Venni A., Ferrazzi V., Grilli G. 2007. *Haemorrhagic enteritis seroconversion in turkey breeders: field observations*. Italian Journal of Animal Science, **6**: 321-325.
- Cessi D. 1979. *Prophylaxis of Escherichia coli infection in fowls with emulsified vaccines*. Clinica Veterinaria, **102**: 270-278.
- Cha R.M., Khatri M., Sharma J.M. 2006. *Mucosal immunity in avian metapneumovirus*. Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Coronavirus and Pneumovirus and Complicating Pathogens, Rauischholzhausen, Germania, 14-16 maggio, pp. 56-57.
- Chansiripornchai N., Ramasoota P., Sasipreeyajan J., Svenson S.B. 2001. *Differentiation of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis*. Veterinary Microbiology, **80**: 75-83.
- Chary P., Rautenshlein S., Sharma J.M. 2002. *Reduced efficacy of hemorrhagic enteritis virus vaccine in turkeys exposed to avian pneumovirus*. Avian Diseases, **46**: 353-359.
- Chettle N.J., Wyeth P.J. 1988. *Turkey rhinotracheitis: detection of antibodies using an ELISA test*. British Veterinary Journal, **144**: 282-287.
- Cheville N.F., Arp L.H. 1978. *Comparative pathologic findings of Escherichia coli infection in birds*. Journal of the American Veterinary Medical Association, **173**: 584-587.
- Circella E., Pennelli D., Tagliabue S., Ceruti R., Giovanardi D., Camarda A. 2009. *Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia Coli in Turkey*. Italian Journal of Animal Science, **8**: 775-779.
- Collins M.S., Gough R.E., Lister S.A., Chettle N., Eddy R. 1986. *Further characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, **119**: 606.
- Collins M.S., Gough R.E., Alexander D.J. 1993. *Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies*. Avian Pathology, **22**: 469-479.
- Cook J.K.A., Ellis M.M., Dolby C.A., Holmes H.C., Finney P.M., Huggins M.B. 1989. *A live attenuated turkey Rhinotracheitis Virus Vaccine. I. Stability of the Attenuated Strain*. Avian Pathology, **18**: 511-522.
- Cook J.K.A., Ellis M.M., Huggins M.B. 1991. *The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria*. Avian Pathology, **20**: 155-166.

- Cook J.K.A., Jones B.V., Ellis M.M., Li J., Cavanagh D. 1993. *Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies*. Avian Pathology, **22**: 257-273.
- Cook J.K.A., Huggins M.B., Woods M.A., Orbell S.J., Mockett A.P.A. 1995. *Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus*. Veterinary Record, **136**: 392-393.
- Cook J.K.A., Huggins M.B., Orbell S.J., Senne D.A. 1999. *Preliminary antigenic characterization of avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA*. Avian Pathology, **28**: 607-619.
- Cook J.K.A., 2000a. *Avian Rhinotracheitis*. Revue scientifique technique. Office International des Epizooties, **19**: 602-613.
- Cook J.K.A., 2000b. *Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens*. The Veterinary Journal, **160**: 118-125.
- Cook J.K.A., Cavanagh D. 2002. *Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses)*. Avian Pathology, **31**: 117-132.
- Cordioli P., Brocchi E., Sacchi C., Gamba D., Pascucci S., De Simone F. 1990. *Applicazione di un ELISA con anticorpi monoclonali nella diagnostica sierologica della rinotracheite del tacchino. Risultati preliminari*. Zootecnica International, **6**: 54-57.
- Cormican N., Buckley V., Corbett-Feeney G., Sheridan F. 2001. *Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from turkeys and hens in Ireland*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **48**: 587-588.
- Coufal C.D., Chavez C., Knape K.D., Carey J.B. 2003. *Evaluation of a method of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs*. Poultry Science, **82**: 754-759.
- Cowen B.S., Rothenbacher H., Schwartz L.D., Braune M.O., Owen R.L. 1988. *A case of acute pulmonary edema, splenomegaly, and ascites in guinea fowl*. Avian Diseases, **32**: 151-156.
- Dani M.A.C., Arns C.W., Durigon E.L. 1999. *Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates using reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction endonuclease analysis and sequencing of a G gene fragment*. Avian Pathology, **28**: 473-476.
- Davidson I., Aronovici A., Weisman Y., Malkinson M. 1985. *Enzyme immunoassay studies on the serological response of turkeys to hemorrhagic enteritis virus*. Avian Diseases, **29**: 43-52.

- Davis M., Morishita T.Y. 2005. *Relative ammonia concentration, dust concentration, and presence of Salmonella species and Escherichia coli inside and outside commercial layer facilities*. Avian Diseases, **49**: 30-35.
- Deb J.R., Harry E.G. 1976. *Laboratory trials with inactivated vaccines against Escherichia coli (O78 K80) infection in fowls*. Research in Veterinary Science, **20**: 131-138.
- Deb J.R., Harry E.G. 1978. *Laboratory trials with inactivated vaccines against Escherichia coli (O2:K1) infection in fowls*. Research in Veterinary Science, **24**: 308-313.
- Dho M., Lafont J.P. 1984. *Adhesive properties and iron uptake abilities in E. coli lethal and non-lethal for chicks*. Avian Diseases, **28**: 1016-1025.
- Dho-Moulin M., Fairbrother J.M. 1999. *Avian pathogenic Escherichia coli (APEC)*. Veterinary Research, **30**: 299-316.
- D'Incau M., Pennelli D., Lavazza A., Tagliabue S. 2006. *Serotypes of E. coli isolated from Avian Species in Lombardia and Emilia Romagna (North Italy)*. Italian Journal of Animal Science, **5**: 298-301.
- Domermuth C.H., Gross W.B. 1971. *Effect of disinfectants and drying on the virus of hemorrhagic enteritis of turkeys*. Avian Diseases, **15**: 94-97.
- Domermuth C.H., Gross W.B. 1972. *Effect of chlorine on the virus of hemorrhagic enteritis of turkeys*. Avian Diseases, **16**: 952-953.
- Domermuth C.H., Gross W.B., DuBose R.T., Douglass C.S., Reubush Jr C.B. 1972. *Agar gel diffusion precipitin test for hemorrhagic enteritis of turkeys*. Avian Diseases, **16**: 852-857.
- Domermuth C.H., Gross W.B., DuBose R.T. 1973. *Microimmunodiffusion test for hemorrhagic enteritis of turkeys*. Avian Diseases, **17**: 439-444.
- Domermuth C.H., Gross W.B., DuBose R.T., Douglass C.S., Harris J.R., Davis R.B. 1977. *Vaccination of hemorrhagic enteritis in turkeys*. Avian Diseases, **23**: 30-38.
- Domermuth C.H., Gross W.B., Schwartz L.D., Mallinson E.T., Britt R. 1979. *Vaccination of ring-necked pheasant for marble-spleen disease*. Avian Diseases, **23**: 30-38.
- Domermuth C.H., van der Heide L., Faddoul G.P. 1982. *Pulmonary congestion and edema (marble spleen disease) of chickens produced by group II avian adenovirus*. Avian Diseases, **26**: 629-633.

- Domermuth C.H., Gross W.B. 1984. *Hemorrhagic enteritis and related infections*. In: Hofstad S., Barnes H.J., Calnek B.W., Reid W.M., Yoder Jr. H.W. (Eds.). *Diseases of Poultry*, 8th Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp. 511-516.
- Dominick M.A., Jensen A.E. 1984. *Colonization and persistence of Escherichia coli in axenic and monoxenic turkeys*. *American Journal of Veterinary Research*, **45**: 2331-2335.
- Douglas J. *The latest decade of continuous, balanced improvement*. 2010. Technical Bulletin Aviagen Turkeys,-USA, **14**: 1-4. Documento disponibile su internet presso il sito web: <http://en.aviagen.com>
- Dozois C.M., Fairbrother J.M., Harel J., Bossé M. 1992. *pap- and pilrelated DNA sequences and other virulence determinants associated with Escherichia coli isolated from septicemic chickens and turkeys*. *Infection and Immunity*, **60**: 2648-2656.
- Dozois C.M., Dho-Moulin M., Breé A., Fairbrother J.M., Desautels C., Curtiss III R. 2000. *Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian Escherichia coli and localization and analysis of the Tsh genetic region*. *Infection and Immunity*, **68**: 4145-4154.
- Droual R., Chin R.P., Rezvani M. 1996. *Synovitis, osteomyelitis, and green liver in turkeys associated with Escherichia coli*. *Avian Diseases*, **40**: 417-424.
- Easton A.J., Domachowske J.B., Rosenberg H.F. 2004. *Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis*. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**: 390-412.
- Edens F.W., Parkhurst C.R., Casas I.A., Dobrogosz W.J. 1997. *Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of Lactobacillus reuteri*. *Poultry Science*, **76**: 179-196.
- Emery D.A., Nagaraja K.V., Shaw D.P., Newman J.A., White D.G. 1992. *Virulence factors of Escherichia coli associated with colisepticemia in chicken and turkeys*. *Avian Diseases*, **36**: 504-511.
- Etteradossi N., Toquin D., Guittet M., Bennejean G. 1995. *Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge*. *Journal of Veterinary Medicine B*, **42**: 175-186.
- Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C., Wieler L.H. 2004. *Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry*. *Veterinary Microbiology*, **104**: 91-101.
- Ewing W.H. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, Olanda, p. 536.

- Fabris G., D'Aprile P.N. 1990. *Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio*. *Zootecnica International*, **6**: 36-40.
- Fadly A.M., Nazerian K., Nagaraja K., Below G. 1985. *Field vaccination against hemorrhagic enteritis of turkeys by a cell-culture live-virus vaccine*. *Avian Diseases*, **29**: 768-777.
- Fadly A.M., Nazerian K. 1989. *Hemorrhagic enteritis of turkeys: Influence of maternal antibody and age at exposure*. *Avian Diseases*, **33**: 778-786.
- Fantinatti F., Silveira W.D., Castro A.F.P. 1994. *Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic Escherichia coli strains*. *Veterinary Microbiology*, **41**: 75-86.
- Farmer J.J., Fanning G.R., Davis B.R., O'Hara C.M., Riddle C., Hickman Brenner F.W., Asbury M.A., Lowery V.A., Brenner D.J. 1985. *Escherichia fergusonii and Enterobacter tayloreae, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens*. *Journal of Clinical Microbiology*, **21**: 77-81.
- Fasina S.O., Fabricant J. 1982. *In vitro studies of hemorrhagic enteritis virus with immunofluorescent antibody technique*. *Avian Diseases*, **26**: 150-157.
- Fitzgerald S.D., Reed W.M., Burnstein T. 1992. *Detection of type II avian adenoviral antigen in tissue sections using immunohistochemical staining*. *Avian Diseases*, **36**: 341-347.
- Gibson F., Magrath D.I. 1969. *The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by Aerobacter aerogenes 62-I*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **152**: 175-184.
- Ginns C.A., Browning G.F., Benham M.L., Whithear K.G. 1998. *Development and application of an aerosol challenge method for reproduction of avian colibacillosis*. *Avian Pathology*, **27**: 505-511.
- Giovanardi D., Campagnari E., Sperati Ruffoni .L., Pesente P., Ortali G., Furlattini V. 2005. *Avian Pathogenic Escherichia coli transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain*. *Avian Pathology*, **34**: 313:318.
- Giovanardi D., Pesente P., Zuanni S., Bittesnik S., Sperati Ruffoni L., Ortali G. 2007. *Genomic similarities of APEC serotype O78 strains isolated in episodes of colisepticemia in breeders and finishing meat turkeys in Italy*. *Proceedings of the 56th World Poultry Disease Conference, Las Vegas, ND, USA, 26-29 marzo, pp. 9-12.*
- Giraud P., Le Gros F.X., Guittet M., Bouquet J.F., Toquen D., Bennejean G. 1987. *Turkey rhinotracheitis: isolation of a viral agent and first trials with experimental*

- inactivated and attenuated vaccines*. Proceedings of the 36th Western Poultry Disease Conference, Davis, CA, USA, pp. 94-96.
- Giraud E., Leroy-Setrin S., Flaujac G., Cloeckert A., Dho-Moulin M., Chaslus-Dancla E. 2001. *Characterization of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli O78:K80 isolated from turkeys*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **47**: 341-343.
 - Glisson J.R., Hofacre C.L., Mathis G.F. 2004. *Comparative efficacy of enrofloxacin, oxytetracycline, and sulfadimethoxine for the control and mortality caused by Escherichia coli in broiler chickens*. Avian Diseases, **48**: 658-662.
 - Goodwin M.A., Waltman W.D. 1996. *Transmission of Eimeria, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (Alphitobius diaperinus) as vectors of pathogens*. Journal of Applied Poultry Research, **5**: 51-55.
 - Gophna U., Oelchlaeger T.A., Hacker J., Ron, E.Z. 2001. *Yersinia HPI in septicemic Escherichia coli strains isolated from diverse hosts*. FEMS Microbiology Letters, **196**: 57-60.
 - Gough R., Collins M.S. 1989. *Antigenic relationship of three turkey rhinotracheitis viruses*. Avian Pathology, **18**: 227-238.
 - Gough R.E., Jones R.C. 2008. *Avian Metapneumovirus*. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (Eds.). Diseases of Poultry, 12th Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp. 100-110.
 - Gross W.B. 1961. *The development of "air sac disease"*. Avian Diseases, **5**: 431-439.
 - Gross W.B. 1966. *Electrocardiographic changes of Escherichia coli-infected birds*. American Journal of Veterinary Research, **27**: 1427-1436.
 - Gross W.B., Moore W.E.C. 1967. *Hemorrhagic enteritis of turkeys*. Avian Diseases **11**: 296-307.
 - Gross W.B. 1991. *Colibacillosis*. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., Reid W.M., Yoder J.H.W. (Eds), Diseases of Poultry, 9th ed., Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp. 138-144.
 - Gyles C.L. 2008. *Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry*. Animal Health Research Review, **9**: 149-158.
 - Hafez H.M., Woernle H. 1989. *Turkey rhinotracheitis, serological results in Baden-Wuerttemberg*. Tierarztliche Umschau, **44**: 369-376.
 - Hafez H.M. 1993. *The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review*. Arch Geflugelkde., **57**: 181-185.

- Hardy G. 1975. *Colicinogeny and related phenomena*. Bacteriology Review, **39**: 464-515.
- Harry E.G. 1957. *The effect on embryonic and chick mortality of yolk contaminated with bacteria from the hen*. Veterinary Record **69**: 1433-1439.
- Harry E.G., Hemsley L.A. 1965. *The association between the presence of septicaemia strains of Escherichia coli in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia*. Veterinary Record, **77**: 35-40.
- Hart W.S., Heuzenroeder M.W., Barton M.D. 2006. *A study of the transfer of tetracycline resistance genes between Escherichia coli in the intestinal tract of a mouse and a chicken model*. Journal of Veterinary Medicine B, **53**: 333-340.
- Heller E.D., Drabkin N. 1977. *Some characteristics of pathogenic E. coli strains*. British Veterinary Journal, **133**: 572-578.
- Herraes P.A., Rodriguez A., Espinosa de los Monteros A., Acosta B., Jaber J.R., Castellano J., Castroa A. 2005. *Fibrinonecrotic typhlitis caused by Escherichia fergusonii in ostriches*. Avian Diseases, **49**: 167-169.
- Himathongkham S., Riemann H., Bahari S., Nuanualsuwan S., Kass P., Cliver D.O. 2000. *Survival of Salmonella typhimurium and Escherichia coli O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures*. Avian Diseases, **44**: 853-860.
- Hofacre C.L., Johnson A.C., Kelly B.J., Froyman R. 2002. *Effect of a commercial competitive exclusion culture on reduction of colonization of an antibiotic-resistant pathogenic Escherichia coli in day-old broiler chickens*. Avian Diseases, **46**: 198-202.
- Hoschützky H., Lottspeich F., Jann K. 1989. *Isolation and characterization of the alpha-galactosyl-1,4-beta-galactosyl-specific adhesin (P adhesin) from fimbriated Escherichia coli*. Infection and Immunity, **57**: 76-81.
- Huff W.E., Huff G.R., Rath G.H., Balog J.M., Xie H., Moore P.A. Jr., Donoghue A.M. 2002. *Prevention of Escherichia coli respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02)*. Poultry Science, **81**: 437-441.
- Hussain I., Choi C.U., Rings B.S., Shaw D.P., Nagaraja K.V. 1993. *Pathogenesis of hemorrhagic enteritis virus infection in turkeys*. Journal of Veterinary Medicine, **40**: 715-726.
- Ianconescu M., Smith E.J., Fadly A.M., Nazerian K. 1984. *An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hemorrhagic enteritis virus and associated antibodies*. Avian Diseases, **28**: 677-692.

- Ike K, Kawahara K, Danbara H, Kume K. 1992. *Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian Escherichia coli mediated by conjugative 100-megadalton plasmid*. The Journal of Veterinary Medical Science, **54**: 1091-1098.
- Itakura C., Carlson H.C., Lang G.N. 1974. *Experimental transmission of hemorrhagic enteritis of turkeys*. Avian Pathology, **3**: 279-292.
- Ivanov I.E. 2001. *Treatment of broiler litter with organic acids*. Research in Veterinary Science, **70**: 169-173.
- JanBen T., Schwarz C., Preikshat P., Voss M., Hans-C P., Wiewer L. 2001. *Virulence-associated genes in avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis*. International Journal of Medical Microbiology, **291**: 371-378.
- Jiang Y.M., Sims M.D., Conway D.P. 2005. *The efficacy of TAMUS 2032 in preventing a natural outbreak of colibacillosis in broiler chickens in floor pens*. Poultry Science, **84**: 1857-1859.
- Jing L., Cook J.K.A., Brow T.D.K., Shaw K., Cavanagh D. 1993. *Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polimerase chain reaction*. Avian Pathology, **22**: 771-783.
- Jirjis F.F., Noll S.L., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., Martin F., Shaw D.P. 2004. *Effects of Bacterial Coinfection on the Pathogenesis of Avian Pneumovirus Infection in Turkey*. Avian Diseases, **48**: 34-49.
- Johnson J.R., Murray A.C., Gajewsk A., Sullivan M., Snippes P., Kuskowisk M.A., Smith K.E. 2003. *Isolation and molecular characterization of nalidixic acid resistant extraintestinal pathogenic Escherichia coli from retail chicken products*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **47**: 2161-2168.
- Johnson J.R., Kuskowsky M.A., Menard M., Gajewsky A., Xercanvins M., Garau J. 2006. *Similarity between human and chicken Escherichia coli isolates in relation to ciprofloxacin resistance status*. Journal of Infectious Diseases, **194**: 71-78.
- Johnson, L.C., Bilgili S.F., Hoerr F.J., McMurtrey B.L., Norton R.A. 2001. *The influence of Escherichia coli strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis*. Avian Pathology, **30**: 475-479.
- Johnson T.J., Skyberg J., Nolan K.L. 2004. *Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an Escherichia coli isolate incriminated in avian colibacillosis*. Avian Diseases, **48**: 351-360.

- Johnson T.J., Siek K.E., Johnson S.J., Nolan L.K. 2006. *DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli strains*. Journal of Bacteriology, **188**: 745-758.
- Jones R.C., Baxter-Jones C., Wilding G.P., Kelly D.F. 1986. *Demonstration of a candidate virus for turkey rhinotracheitis in experimentally inoculated turkeys*. Veterinary Record, **119**: 599-600.
- Jones R.C., Williams R.A., Baxter-Jones C., Savage C.E., Wilding G.P. 1988. *Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response*. Avian Pathology, **17**: 841-850.
- Jones R.C., Naylor C.J., Bradbury J.M., Savage C.E., Worthington K., Williams R.A. 1991. *Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England*. Veterinary Record, **129**: 509-510.
- Jones R.C., Naylor C.J., Al-Afaleq A., Worthington K.J., Jones R. 1992. *Effect of cyclophosphamide immunosuppression on the immunity of turkeys to viral rhinotracheitis*. Research in Veterinary Science, **53**: 38-41.
- Jones R.C. 1996. *Avian Pneumovirus infection: questions still unanswered*. Avian Pathology, **25**: 639-648.
- Jordan F.T.W, Williams N.J., Wattret A., Jones T. 2005. *Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock*. Veterinary Record, **157**: 573-577.
- Juhasz K., Easton A.J. 1994. *Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups*. Journal of General Virology, **75**: 2873-2880.
- Kariyawasam S., Johnson T.J., Nolan L.K. 2006. *The pap operon of avian pathogenic Escherichia coli strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island*. Infection and Immunity, **74**: 744-749.
- Kehra R.S., Jones R.C. 1999. *In vitro and in vivo studies on the pathogenicity of avian pneumovirus of the chicken oviduct*. Avian Pathology, **28**: 257-262.
- Kles V., Morin M., Picault J.P., Drouin P., Guittet M., Bennejean G. 1987. *Isolement d'un virus dans un cas de syndrome infectieux du gonflement de la tete avec coryza chez la pintade*. L'aviculteur, **483**: 112.
- Kwaga J.K., Allan B.J., van der Hurk J.V., Seida H., Potter A.A. 1994. *A carAB mutant of avian pathogenic Escherichia coli serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys*. Infection and Immunity, **62**: 3766-3772.

- Lanz R., Kuhnert P., Boerlin P. 2003. *Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland*. Veterinary Microbiology, **91**: 73-84.
- La Ragione R.M., Casula G., Cutting S.M, Woodward M.J. 2001. *Bacillus subtilis spores competitively exclude Escherichia coli O78:K80 in poultry*. Veterinary Microbiology, **79**: 133-142.
- Larsen C.T., Domermuth C.H., Sponenberg D.P., Gross W.B. 1985. *Colibacillosis of Turkeys Exacerbated by Hemorrhagic Enteritis Virus. Laboratory Studies*. Avian Diseases, **29**: 729-732.
- Latham R.H., Stamm W.E. 1994. *Role of fimbriated Escherichia coli in urinary tract infections in adult women: Correlation with localization studies*. Journal of Infectious Diseases, **149**: 835-840.
- Lee E.H., Song M.S., Shin J.Y., Lee Y.M., Kim C.J., Lee Y.S., Kim H., Choi Y.K. 2007. *Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market*. Virus Research, **128**: 18-25.
- Leitner G., Melamed D., Drabkin N., Heller E.D. 1990. *An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Escherichia coli: association between indirect hemagglutination test and survival*. Avian Diseases, **34**: 58-62.
- Leitner G., Heller E.D. 1992. *Colonization of Escherichia coli in young turkeys and chickens*. Avian Diseases, **36**: 211-220.
- Liman M., Rautenschlein S. 2007. *Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B*. Veterinary Immunology and Immunopathology, **115**: 273-285.
- Ling R., Sinkovic S., Toquin D., Guionie O., Eteradossi N., Easton A.J. 2008. *Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame*. Journal of General Virology, **89**: 525-533.
- Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Pesente P., Sperati Ruffoni L., Catelli E. 2010. *Discriminazione rapida fra ceppi vaccinali e di campo di Metapneumovirus aviare mediante tecnica RFLP*. Atti del 49° Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì, 29-30 aprile, pp.177-180.
- Lutful Kabir S.M. 2010. *Avian Colibacillosis and Salmonellosis: a Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns*. International Journal of Environmental Research and Public Health, **7**: 89-114.

- Marien M., Decostere A., Martel A., Chiers K., Froyman R., Nauwynck H. 2005. *Synergy between avian pneumovirus and Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys*. Avian Pathology, **34**: 204-211.
- Massi P., Gelmetti D., Sironi G., Dottori M., Lavazza A., Pascucci S. 1995. *Adenovirus-associated haemorrhagic disease in guinea fowl*. Avian Pathology, **24**: 227-237.
- Maurer J.J., Lee M.D., Lobsinger C., Brown T., Maier M., Thayer S. G. 1998a. *Molecular Typing of Avian Escherichia coli Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA*. Avian Diseases, **42**: 431-451.
- Maurer J.J., Brown T.P., Steffens W.L., Thayer S.G. 1998b. *The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian Escherichia coli*. Avian Diseases, **42**: 106-118.
- McDougall J.S., Cook J.K.A. 1986. *Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations*. Veterinary Record, **118**: 206-207.
- McNamee P.T., Smyth JA. 2000. *Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (femoral head necrosis) of broiler chickens: a review*. Avian Pathology, **29**: 253-270.
- Mellata M., Dho-Moulin M., Dozois C.M., Curtiss III R., Brown P.K., Arné P., Breé A., Desautels C., Fairbrother J.M. 2003. *Role of virulence factor in resistance of avian pathogenic Escherichia coli to serum and in pathogenicity*. Infection and Immunity, **71**: 536-540.
- Meteyer C.U., Mohammed H.O., Chin R.P., Bickford A.A., Trampel D.W., Klein P.N. 1992. *Relationship between age of flock seroconversion to hemorrhagic enteritis virus and appearance of adenoviral inclusions in the enteritis and renal tubule epithelia of turkeys*. Avian Diseases, **36**: 88-96.
- Miles T., McLaughlin W., Brown P. 2006. *Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolates from broiler chickens and humans*. BMC Veterinary Research, **2**: 7.
- Mol O., Oudega B. 1996. *Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in Escherichia coli*. FEMS Microbiology Reviews, **19**: 25-52.
- Montgomery R.D., Boyle C.R., Lenarduzzi T.A., Jones L.S. 1999. *Consequences to chicks hatched from Escherichia coli-inoculated embryos*. Avian Diseases, **43**: 553-563.
- Moon H.W. 1990. *Colonization factor antigens of Enterotoxigenic Escherichia coli in animals*. Current Topics in Microbiology Immunology, **151**: 148-165.
- Moran C.A., Scholten R.H., Tricarico J.M., Brooks P.H., Verstegen M.W. 2006. *Fermentation of wheat: effects of backslipping different proportions of pre-fermented*

- wheat on the microbial and chemical composition. *Archives of Animal Nutrition*, **60**: 158-169.
- Mutalib A., Miguel B., Brown T., Maslin W. 1996. *Distribution of arthritis and osteomyelitis in turkeys with green liver discoloration*. *Avian Diseases*, **40**: 661-664.
 - Nagaraja K.V., Emery D.A., Jordan K.A., Newman J.A., Pomeroy B.S. 1983. *Scanning electron microscopic studies of adverse effects of ammonia on tracheal tissues of turkeys*. *American Journal of Veterinary Research*, **44**: 1530-1536.
 - Nagaraja, K.V., Emery D.A., Jordan K.A., Sivanandan V., Newman J.A., Pomeroy B.S. 1984. *Effect of ammonia on the quantitative clearance of Escherichia coli from lungs, air sacs, and livers of turkeys aerosol vaccinated against Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary Research*, **45**: 392-395.
 - Nagi M.S., Mathey W.J. 1972. *Interaction of Escherichia coli and Eimeria brunetti in chickens*. *Avian Diseases*, **16**: 864-873.
 - Nandi S., Maurer J.J., Hofacre C., Summers A.O. 2004. *Gram positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter*. *Proceedings of the National Academic of Science USA*, **101**: 7118-7122.
 - Naylor C.J., Al-Ankari A.R., Al-Afaleq A.I., Bradbury J.M., Jones R.C. 1992. *Exacerbation of Mycoplasma gallisepticum infection in turkeys by rhinotracheitis virus*. *Avian Pathology*, **21**: 295-305.
 - Naylor C.J., Jones R.C. 1993. *Turkey rinotracheitis virus: a review*. *Veterinary Bulletin*, **63**: 439-449.
 - Naylor C.J., Worthington K.J., Jones R.C. 1997a. *Failure of maternal antibodies to protect young turkey poults against challenge with turkey rhinotracheitis virus*. *Avian Disease*, **41**: 968-971.
 - Naylor C., Shaw K., Britton P., Cavanagh D. 1997b. *Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain*. *Avian Pathology*, **26**: 327-338.
 - Naylor C.J., Cavanagh D., Jones R.C. 2002. *Live TRT vaccination in the UK: past, present and future*. *Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey Diseases*, Berlino, Germania, 15-18 maggio, pp. 151-153.
 - Newberry L.A., Skeeles J.K, Kreider D.L, Beasley J.N., Story J.D, McNew R.W, Berridge B.R. 1993. *Use of virulent hemorrhagic enteritis virus for the induction of colibacillosis in turkeys*. *Avian Diseases*, **37**: 1-5.
 - Ngeleka M., Kwaga J.K.P., White D.G., Whittam T.S., Riddell C., Goodhope R., Potter A.A., Allan B. 1996. *Escherichia coli cellulitis in broiler chickens: Clonal relationships*

among strains and analysis of virulence-associated factor of isolates from diseased birds. Infection and Immunity, **64**: 3118-3126.

- Nogrady N., Pasztyi J., Piko H., Nagy B. 2006. *Class I integrons and their conjugal transfer with and without virulence-associated genes in extra-intestinal and intestinal Escherichia coli in poultry.* Avian Pathology, **35**: 349-356.
- Ogawa A., Murakami S., Natane T. 2001. *Field cases of swollen-head syndrome in pheasant.* Journal of the Japanese Veterinary Medical Association, **54**: 87-91.
- Okeke I.N., Scaletsky I.C.A., Soars E.H., MacFarlane L.R., Torres A.G. 2004. *Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative Escherichia coli.* Journal of Clinical Microbiology, **42**: 36-44.
- O'Loan C.J., Allan G.M., McNair J., Mackie D.P., McNulty M.S. 1990. *TRT virus serology: discrepancy between ELISA and indirect immunofluorescence.* Avian Pathology, **19**: 173-180.
- Opengart K., Eyre P., Domermuth C.H. 1992. *Increased numbers of duodenal mucosal mast cells in turkeys inoculated with hemorrhagic enteritis virus.* American Journal of Veterinary Research, **53**: 814-819.
- Oyetunde O.O.F., Thomson R.G., Carlson H.C. 1978. *Aerosol exposure of ammonia, dust and Escherichia coli in broiler chickens.* Canadian Veterinary Journal, **19**: 187-193.
- Pedersen J.C., Reynolds L., Ali A. 2000. *The sensitivity and specificity of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain).* Avian Diseases, **44**: 681-685.
- Petersen A., Christiansen J.P., Kuhnert P., Bisgaard M., Olsen J.E. 2006. *Vertical transmission of a fluoroquinolone-resistant Escherichia coli within and integrated broiler operation.* Veterinary Microbiology, **116**: 120-128.
- Petridis M., Bagdasarian M., Waldor M.K., Walker E. 2006. *Horizontal transfer of Shiga toxin and antibiotic resistance genes among Escherichia coli strains in house fly gut.* Journal of Medical Entomology, **43**: 288-295.
- Pfaff-McDonough S.J., Home S.M., Giddings C.W., Ebert J.O., Doetkott C., Smith M.H., Nolan L.K. 2000. *Complement resistance-related traits among Escherichia coli isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis.* Avian Diseases, **44**: 23-33.
- Picault J.P., Giraud P., Drouin M., Guittet M., Bennejean G., Lamande J., Toquin D., Gueguen C. 1987. *Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome.* Veterinary Record, **121**: 135.

- Pierson F.W. 1993. *The roles of multiple infectious agents in the predisposition of turkeys colibacillosis*. PhD dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.
- Pierson F.W., Barta V.D., Boyd D., Thompson W.S. 1996a. *Exposure to multiple infectious agents and the development of colibacillosis in turkeys*. Journal of Applied Poultry Research, **5**: 347-357.
- Pierson F.W., Larsen C.T, Domermuth C.H. 1996b. *The production of colibacillosis in turkeys following sequential exposure to Newcastle disease virus or Bordetella avium, avirulent hemorrhagic enteritis virus, and Escherichia coli*. Avian Diseases, **40**: 837-840.
- Pierson F.W., Domermuth C.H. 1997. *Hemorrhagic enteritis, marble spleen disease, and related infections*. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., Saif Y.M. (Eds.). Diseases of Poultry, 10th Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp. 624-632.
- Pierson F.W., Domermuth C.H., Gross W.B. 1998. *Hemorrhagic enteritis of turkeys and marble spleen disease of pheasants*. In: Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M. (Eds). A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th Ed., American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, USA, pp. 106-110.
- Pierson F.W., Fitzgerald S.D. 2008. *Hemorrhagic Enteritis and Related Infections*. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (Eds.). Diseases of Poultry, 12th Ed., Iowa State University Press, Ames, IA, USA, pp. 276-286.
- Pomeroy B.S., Fenstermacher R. 1937. *Hemorrhagic enteritis in turkeys*. Poultry Science, **16**: 378-382.
- Pourbakhsh S.A., Dho-Moulin M., Breé A., Desautels C., Martineau-Doize B., Fairbrother J.B. 1997a. *Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic Escherichia coli*. Microbial Pathogen, **22**: 231-341.
- Pourbakhsh S.A., Boulianne M., Martineau-Doize B., Fairbrother J.M. 1997b. *Virulence mechanisms of avian fimbriated Escherichia coli in experimentally inoculated chickens*. Veterinary Microbiology, **58**: 195-213.
- Pourbakhsh S.A., Boulianne M., Martineau-Doize B., M.Dozois C., Desautels C., Fairbrother J.M. 1997c. *Dynamics of Escherichia coli infection in experimentally inoculated chickens*. Avian Diseases, **41**: 221-233.

- Provence D.L., Curtiss III R. 1994. *Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic Escherichia coli strains*. Infection and Immunity, **62**: 1369-1380.
- Rautenschlein S., Suresh M., Newmann U., Sharma J.M. 1998. *Comparative pathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) infection in turkeys and chickens*. Journal of Comparative Pathology, **119**: 251-261.
- Rautenschlein S., Sharma J.M., 2000. *Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys*. Developmental and Comparative Immunology, **24**: 237-246.
- Rautenschlein, S., Suresh M., Sharma J.M. 2000. *Pathogenic avian adenovirus type II induces apoptosis in turkey spleen cells*. Archives of Virology, **145**: 1671-1683.
- Ricchizzi E., Catelli E., Cecchinato M., Lupini C., Brown P., Naylor C.J. 2008. *Disease associated with 7 week old isolation of an avian metapneumovirus vaccine derived virus*. Proceedings of the 7th International Symposium on Turkey Diseases, Berlino, Germania, 19-21 giugno, pp. 171-175.
- Rochon K., Lysyk T.J., Selinger L.B. 2004. *Persistence of Escherichia coli in immature house fly in relation to larval growth and survival*. Journal of Medical Entomology, **42**: 397-403.
- Rosario C.C., Lopez A.C., Tellez I.G., Navarro O.A., Anderson R.C., Elsave C.C. 2004. *Serotyping and virulence genes detection in Escherichia coli isolated from infertile and fertile eggs, dead in shell embryos, and chickens with yolk sac infection*. Avian Diseases, **48**: 791-802.
- Rubbenstroth D., Ryll M., Behr K.P., Rautenschlein S. 2007. *Does avian metapneumovirus (aMPV) exacerbate disease caused by Riemerella Anatipestifer (RA) in turkeys?*. Proceedings of the 56th World Poultry Disease Conference, Las Vegas, ND, USA, 26-29 marzo, pp. 25-28.
- Salmon S.A., Watts J.L. 2000. *Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poults*. Avian Diseases, **44**: 85-98.
- Saunders G.K., Pierson F.W., van den Hurk J.V. 1993. *Haemorrhagic enteritis virus infection in turkeys: A comparison of virulent and avirulent virus infections, and a proposed pathogenesis*. Avian Pathology, **22**: 47-58.
- Senne D.A., Edson R.K., Pedersen J.C., Paigrahy B. 1997. *Avian pneumovirus update*. Proceedings of the 134th American Veterinary Medical Association, Reno, NV, USA, 19-24 luglio, p. 190.

- Shane S.M., Faust A. 1996. *Evaluation of sanitizers for hatching eggs*. Journal of Applied Poultry Research, **5**: 134-138.
- Sharada R., Krishnappa G., Upendra H.A. 2001. *Serological 'O' grouping and drug susceptibility of Escherichia coli strains from chicken*. Indian Veterinary Journal, **78**: 78-79.
- Silveira W.D., Ferreira A., Brocchi M., Hollanda L.M., Castro A.F.P., Yamada A.T., Lancellotti M. 2002. *Biological characteristics and pathogenicity of avian Escherichia coli strains*. Veterinary Microbiology, **85**: 47-53.
- Sojka W.J., Carnaghan R.B.A. 1961. *Escherichia coli infections in poultry*. Research in Veterinary Science, **2**: 340-352.
- Sponenberg D.P., Domermuth C.H., Larsen C.T. 1985. *Field Outbreaks of Colibacillosis of Turkeys Associated with Hemorrhagic Enteritis Virus*. Avian Diseases, **29**: 838-842.
- Stehling E.G., Yano T., Brocchi M., Silveira W.D. 2003. *Characterization of a plasmid-encoded adhesion of an avian pathogenic Escherichia coli (APEC) strains isolated from a case of swollen head syndrome (SHS)*. Veterinary Microbiology, **95**: 111-120.
- Stenutz R., Weintraub A., Widmalm G. 2006. *The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens*. FEMS Microbiology Review, **30**: 382-403.
- Stuart J.C. 1989. *Rinotracheitis: turkey rinotracheitis in Great Britain*. In: Nixey C., Grey T.C. (Eds.). Recent advances in turkey science. Butterworths, London, UK, pp. 217-224.
- Suresh M., Sharma J.M. 1995. *Hemorrhagic enteritis virus induced changes in the lymphocyte subpopulations in turkeys and the effect of experimental immunodeficiency on viral pathogens*. Veterinary Immunology and Immunopathology, **45**: 139-150.
- Suresh M., Sharma J.M. 1996. *Pathogenesis of type II avian adenovirus infection in turkeys: in vivo immune cell tropism and tissue distribution of the virus*. Journal of Virology, **70**: 30-36.
- Thangapandian E., Vijayarani, Ramadass P., Naimar A.M. 2006. *Distribution of virulence associated genes in avian pathogenic Escherichia coli isolates from Tamil Nadu*. Indian Journal of Animal Science, **76**: 485-490.
- Trampel D.W., Griffith R.W. 1997. *Efficacy of aluminum hydroxide-adjuvanted Escherichia coli bacterin in turkey poults*. Avian Diseases, **41**: 263-268.
- Trampel D.W., Wannemuheler I, Nolan L.K. 2007. *Characterization of E. coli Isolates from Peritonitis Lesions in Commercial Laying Hens*. Avian Diseases, **51**: 840-844.

- Toquin D., Etteradossi N., Guittet M. 1996. *Use of a related ELISA antigens for efficient TRT serological testing following live vaccination.* Veterinary Record, **139**: 71-72.
- Toquin D., Bayon-Aboyer M.H., Etteradossi N., Morin H., Jestin V. 1999. *Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck.* Veterinary Record, **145**: 680.
- Toquin D., Guionie O., Jestin V., Zwingelstein F., Allee C., Etteradossi N. 2006. *European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages.* Virus Genes, **32**: 97-103.
- Townsend E., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., Shaw D.P. 2000. *Susceptibility of an avian pneumovirus isolated from Minnesota turkey to physical and chemical agents.* Avian Diseases, **44**: 336-342.
- Turpin E.A., Perkins L.E., Swayne D.E. 2002. *Experimental infection of turkeys with avian pneumovirus and either Newcastle disease virus or Escherichia coli.* Avian Diseases, **46**: 412-422.
- Unione Nazionale dell'Avicoltura. 2010. *L'annata avicola 2010, la rivincita del pollo.* Documento disponibile su internet al sito web: <http://www.unionenazionaleavicoltura.it>
- Vandemaele F., Vereecken M., Derijcke J., Goddeeris M. 2002. *Incidence and antibiotic resistance of pathogenic Escherichia coli among poultry in Belgium.* Veterinary Record, **151**: 355-356.
- Van den Hurk J.V. 1986. *Quantitation of hemorrhagic enteritis virus antigen and antibody using enzyme-linked immunosorbent assays.* Avian Diseases, **30**: 662-671.
- Van den Hurk J.V. 1988. *Characterization of group II avian adenoviruses using a panel of monoclonal antibodies.* Canadian Journal of Veterinary Research, **52**: 458-467.
- Van den Hurk J.V., Allan B.J., Riddell C, Watts T., Potter A.A. 1994. *Effect of infection with hemorrhagic enteritis virus on susceptibility of turkeys to Escherichia coli.* Avian Diseases, **38**: 708-716.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Pensaert M. 2001. *The clinical, pathological and microbiological outcome of an Escherichia coli O2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys.* Veterinary Microbiology, **81**: 353-365.
- Van Loock M., Loods K., Van de Zande S., Van Heerden M., Nauwynck H., Goddeeris B.M, Vanrompay D. 2006. *Pathogenic interactions between Chlamydoxyla psittaci and avian pneumovirus infections in turkeys.* Veterinary Microbiology, **112**: 53-63.
- Velayudhan B.T., Lopes V.C., Noll S.L., Halvorson D.A., Nagaraja K.V. 2003. *Avian pneumovirus and its survival in poultry litter.* Avian Diseases, **47**(3):764-768.

- Vinco L., Alessandri E., Della Valentina M. 2008. *Enterite emorragica nel tacchino: esperienze di campo in Italia*. Atti della Tavola Rotonda SIPA, Teramo, 16 maggio, pp. 25-34.
- White D.G., Dho-Moulin M., Wilson R.A., Whittam T.S. 1993. *Clonal relationships and variation in virulence among Escherichia coli strains of avian origin*. Microbiology Pathology, **14**: 399-409.
- White D.G. 2006. *Antimicrobial resistance in pathogenic Escherichia coli from animals*. In: Aarestrup F.M. (Ed.). Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 145-166.
- Williams P.H., Griffiths E. 1992. *Bacterial transferrin receptors-structure, function and contribution to virulence*. Medical Microbiology and Immunology, **181**: 301-322.
- Wooley R.E., Brown J., Gibbs P.S., Nolan L.K., Turner K.R. 1994. *Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V-producing, avirulent, and mutant colicin V-producing avian Escherichia coli*. Avian Diseases, **38**: 141-145.
- Wooley R.E., Gibbs P.S., Brown T.P., Glisson J.R., Steffens W.L., Maurer J.J. 1998. *Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian Escherichia coli transformed with plasmid pHK11*. Avian Diseases, **42**: 194-198.
- Wray C., Woodward M.J. 1997. *Escherichia coli infections in farm animals*. In: Sussman M. (Ed.). *Escherichia coli Mechanisms of Virulence*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 49-84.
- Wyeth P.J., Gough R.E., Chettle N., Eddy R. 1986. *Preliminary observations on a virus associated with turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, **119**: 139.
- Wyeth P. 1990. *Turkey rhinotracheitis and swollen head syndrome cause heavy loss*. Poultry Digest, **49**: 16-21.
- Yang H., Chen S., White D.G., Zhao S., McDermott P., Walker R., Meng J. 2004. *Characterization of multiple-antimicrobial-resistant Escherichia coli isolates from diseased chickens and swine in China*. Journal of Clinical Microbiology, **42**: 3483-3489.
- Zanella A., Alborali G.L., Bardotti M., Candotti P., Guadagnini P.F., Moreno A., Stonfer M., 2000. *Severe Escherichia coli O111 septicemia and polyserositis in hens at the start of lay*. Avian Pathology, **29**: 311-317.
- Zhao S., Maurer J.J., Hubert S., De Villena J.F., McDermott P.F., Meng J., Ayers S., English L., White D.G., 2005. *Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic Escherichia coli isolates*. Veterinary Microbiology **107**: 215-224.

RINGRAZIAMENTI

- Un doveroso ringraziamento a Mario Innocenti, al Dott. Luigi Sperati Ruffoni e al Dott. Giovanni Ortali per aver autorizzato lo svolgimento del dottorato di ricerca presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna.
- Un sentito ringraziamento alla Prof.ssa Elena Catelli, mia tutor durante il dottorato, perché solamente grazie alla sua esperienza e notevole capacità di ricerca sono riuscito a completare questa opera.
- Un ringraziamento speciale alla Dott.ssa Martina Giacomelli dell'Università di Padova per il prezioso lavoro di revisione e l'egregio supporto informatico nella produzione della presente opera.
- Ringrazio la Dott.ssa Caterina Lupini dell'Università di Bologna per l'efficiente lavoro effettuato nella diagnosi di AMPV e per la revisione del capitolo relativo.
- Ringrazio i colleghi del Laboratorio Tre Valli, Claudio Margonari, Dott.ssa Patrizia Pesente, Dott.ssa Giulia Rossi, Fabio Perini e Franco Aldegheri per il lavoro analitico di supporto.
- Un grande ringraziamento al Dott. Mattia Cecchinato dell'Università di Padova per avermi incoraggiato ad intraprendere questo progetto di dottorato.
- Ringrazio per ultimo, ma non in ordine di importanza, il collega Dott. Mario Saita per avermi fornito materiale scientifico utile per la stesura della tesi.
- Non possono dimenticare, con stima, Mario, che mi ha accolto nel suo allevamento per questi tre anni (assieme al suo "cagnone" che ora non c'è più). A lui un sentito ringraziamento per la sua disponibilità e gentilezza durante la fase di campionamento del mio studio.