



SOCIETÀ ITALIANA DI
PATOLOGIA AVIARIA
(S.I.P.A.)

CAMERA DI COMMERCIO
INDUSTRIA ARTIGIANATO
E AGRICOLTURA DI
FORLÌ-CESENA



XXXIX
Convegno Annuale
Società Italiana Patologia Aviaria
(S.I.P.A.)

***"LE CAMPILOBACTERIOSI
AVIARIE"***

Relazioni e Comunicazioni

Forlì,
5-6 ottobre 2000

LA SUB-TIPIZZAZIONE DEL *Campylobacter jejuni* ED IL SUO UTILIZZO PRATICO NELLE INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE DELLE CAMPILOBACTERIOSI AVIARIE**D.G. Newell**

Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, KT15 3NB, United Kingdom

Parole chiave: *subtipizzazione, classificazione, diagnosi epidemiologia, Campylobacter jejuni***The subtyping of *Campylobacter jejuni* and its practical use in epidemiological investigation of poultry campylobacters**Key words: *subtyping, epidemiology, diagnosis, classification, Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni è la principale causa di enterite acuta batterica dell'uomo nel regno Unito, con una stima annua di mezzo milione di casi, sulla base di recenti studi sulle comunità (Tompkins *et al.*, 13). Sulla base di studi caso-controllo, si presume che la sia principalmente di origine alimentare e che il consumo e manipolazione di carne cruda o poco cotta rappresenti il fattore di rischio principale. Tuttavia, dal momento che i *Campylobacter* sono ubiquitari a livello ambientale e sono in grado di colonizzare la maggior parte delle specie di interesse zootecnico, l'origine e le modalità di infezioni nell'uomo sono ancora oggetto di discussione. Per altre malattie di origine alimentare quali la salmonellosi, gli studi epidemiologici finalizzati a identificare le sorgenti di infezione hanno beneficiato in maniera consistente dei metodi in grado di localizzare gli organismi lungo la catena alimentare.

Campylobacter jejuni e l'altro microrganismo correlato, *C.coli*, sono due specie batteriche differenti. I primi studi effettuati hanno dimostrato una consistente differenza fenotipica relativamente a proprietà biochimiche (biotipizzazione), antigeniche (sierotipizzazione) e tipizzazione fagica. Tutte queste proprietà sono state utilizzate per la sub-tipizzazione (Newell *et al.*, 10). Altre proprietà fenotipiche quali profili proteici e degli acidi grassi potrebbero inoltre essere utilizzati come potenziali strumenti di fenotipizzazione. Nonostante ciò nei primi lavori ci si è basati principalmente sulla sierotipizzazione. Esistono due principali schemi di sierotipizzazione; lo schema Penner, basato sull'utilizzo di antigeni stabili al calore (Penner & Hennessy, 11) e lo schema Lior, che utilizza antigeni labili al calore (Lior *et al.*, 8). Le basi antigeniche di entrambi questi metodi sono oggi oggetto di ampia discussione. Inizialmente si pensava che lo schema di Penner fosse basato sul LPS, ma più recenti studi dimostrerebbero che è coinvolto un polisaccaride capsulare (Karlyshev *et al.*, 6). Analogamente lo schema di Lior si riteneva correlato ad antigeni flagellari ma potrebbero invece essere coinvolti alcuni antigeni di superficie termolabili (Doig *et al.*, 2). Recentemente è stato messo a punto un terzo schema, nuovamente basato su antigeni termostabili (Frost *et al.*, 4), che è stato ampiamente utilizzato nel Regno Unito. Tutti questi schemi di sierotipizzazione necessitano di un gran numero (più di 100) di antisieri di coniglio specifici per ciascun sierotipo. Questi sieri sono costosi da produrre ed è anche difficile garantirne una standardizzazione qualitativamente valida. Di conseguenza la sierotipizzazione è confinata ad essere eseguita solo in alcuni laboratori specialistici (Newell *et al.*, 10). Un ulteriore serio problema della sierotipizzazione è che molti ceppi batterici, e fra questi soprattutto quelli di interesse veterinario, risultano non-tipizzabili. Proprio

al fine di ovviare a questa impossibilità di tipizzazione, in alcuni laboratori di riferimento si è aggiunta la tipizzazione fagica quale secondo livello di tipizzazione (Newell *et al.*, 10). Tuttavia per la ridotta disponibilità di fagi ben definiti, anche questo metodo viene eseguito in pochi laboratori specialistici. A causa di tutti questi problemi contingenti che presentano i metodi di fenotipizzazione, si sono cercati dei metodi alternativi di tipizzazione.

Recentemente sono stati sviluppati diversi metodi che sfruttano le diverse sequenze esistenti nel DNA dei ceppi di *C.jejuni/coli* (Wassenaar & Newell, 15). Questi metodi di tipizzazione genetica possono in generale essere suddivisi in (1) metodi che evidenziano le diversità presenti in un singolo loco genomico, ad esempio il *fla*-typing (Ayling *et al.*, 1) (Nachamkin *et al.*, 9) e (2) metodi che rivelano le differenze presenti nell'intero genoma, quali, ad esempio, la "*pulsed field electrophoresis (PFGE)*" (Yan *et al.*, 17) o l'"*amplified fragment length polymorphism*" (Duim *et al.*, 3) (Kokotovic & On, 7).

Tutti questi metodi genotipici hanno il pregio di poter tipizzare la stragrande maggioranza di ceppi, ed inoltre, potendo tutti questi metodi di biologia molecolare essere eseguiti indipendentemente dalla disponibilità di reagenti specifici, essi possono essere adottati da molti laboratori a patto che vi siano le necessarie competenze strumentali e tecniche. Ogni metodo presenta dei vantaggi e degli svantaggi (Tabella 1). La scelta del metodo deve essere fatta in base alle risorse disponibili ed al tipo di informazione che si vuol trarre. In molti casi è meglio predisporre un'indagine multistadio in modo tale da ottenere il massimo risultato possibile.

Un problema noto della tipizzazione genetica dei *Campylobacter* è stata la loro instabilità genomica (Wassenaar & Newell, 10). Tale instabilità è il risultato di riarrangiamenti intergenici, mosaicismi genomici o trasformazioni naturali. Tali eventi possono verificarsi a livello di singoli loci o dell'intero genoma e possono così condizionare l'esito del *fla*-typing (Harrington *et al.*, 5) e del PFGE (Wassenaar *et al.*, 16).

La frequenza con cui si verificano tali fenomeni e la loro reale importanza sono però ancora oggetto di discussione. Sembrerebbe che la instabilità genetica possa diventare un problema per la corretta identificazione delle diversità esistente tra i diversi ceppi solo per periodi di tempo molto lunghi o distanze geografiche considerevoli. Di certo i dati recentemente acquisiti nel nostro laboratorio, con tecniche di tipizzazione genomica (AFLP, PFGE and *fla*-typing), indicano che alcuni cloni di *C.jejuni* sono considerevolmente stabili.

Le tecniche di epidemiologia molecolare sono state recentemente utilizzate in studi epidemiologici

veterinari ed in particolare per verificare l'origine e le modalità di trasmissione nei diversi gruppi di pollame e della contaminazione dei macelli avicoli.

Origine e modalità di infezione nel pollame

Per molte ragioni, almeno nel Regno Unito, la colonizzazione dei gruppi aviari può essere considerata un focolaio singolo e a breve termine. Ciascun gruppo viene a contatto con un limitato numero di ceppi di *Campylobacter* (uno o due al massimo) (Ayling *et al.*, 1). I nostri studi hanno dimostrato che talvolta, ma non sempre, i ceppi che colonizzano un gruppo possono essere isolati nell'ambiente circostante l'allevamento. Tuttavia, poiché tutta una serie di sottotipi di *Campylobacter* sono ubiquitari nell'ambiente circostante l'allevamento, ciò suggerisce che non tutti i ceppi hanno le stesse possibilità di penetrare in allevamento, o, in alternativa, non tutti sono in grado di causare infezione nel pollame.

Nella nostra indagine condotta in 100 diversi allevamenti, in circa il 25% dei gruppi consecutivi nella stessa unità, abbiamo constatato che lo stesso ceppo era trasmesso da un gruppo all'altro. Frequentemente i ceppi che erano trasmessi alla generazione successiva erano quelli isolati con minor frequenza nel precedente gruppo.

Tuttavia, dal momento che i *Campylobacter* non sono mai stati isolati in ambienti adeguatamente puliti e disinfettati, questa trasmissione intergruppi è possibile possa verificarsi a seguito di contaminazioni residue esterne all'allevamento, quali acque stagnanti o uccelli selvatici che agirebbero da reservoir.

Una volta identificata, l'infezione negli allevamenti avicoli progredisce assai rapidamente e si suppone che ciò avvenga per via oro-fecale. A causa della velocità di trasmissione è però difficile determinare le vie e modalità di diffusione negli allevamenti avicoli commerciali. Utilizzando un allevamento di broiler "multi-pen", nel quale effettivamente i contatti fra piccoli gruppi di animali erano numericamente inferiori, abbiamo potuto identificare il punto di colonizzazione iniziale e seguire la diffusione del batterio nel tempo (Shreeve *et al.*, 12). Questi studi hanno dimostrato che la contaminazione si era verificata a seguito dell'utilizzo di alcune porte d'ingresso ed uscita secondarie, non adeguatamente protette e controllate, e che la successiva trasmissione era rallentata dal ridotto contatto diretto fra animali.

Contaminazione dei macelli avicoli

Dal confronto dei ceppi di *Campylobacter* isolati dagli animali vivi al momento della macellazione e dalle carcasse, in vari momenti delle fasi di processo di lavorazione fino al prodotto finale, abbiamo potuto dimostrare che non tutti i *Campylobacter* aviari sono in grado di sopravvivere alle condizioni ambientali che si hanno durante le fasi di macellazione. In altre parole, alcuni ceppi sono più resistenti di altri, e questi ceppi hanno maggiori probabilità di sopravvivere nei prodotti carnei (Newell *et al.*, dati non pubblicati). La possibilità che almeno uno di questi ceppi resistenti fosse in grado di causare infezione nell'uomo, è stata dimostrata a seguito di un'infezione umana acquisita accidentalmente nel corso del campionamento eseguito nello stesso macello di cui sopra (Toszeghy *et al.*, 14).

Inoltre, i nostri studi hanno anche dimostrato che le carcasse provenienti da gruppi *campylobacter-free*,

possono essere contaminate da batteri acquisiti durante le fasi di macellazione ed anche da *Campylobacter* presenti nelle gabbie d'imbalsaggio usate per il trasporto degli uccelli dall'allevamento al macello.

In conclusione, un miglioramento delle misure di biosicurezza è la principale strategia applicabile per ridurre la colonizzazione da *Campylobacter* dei gruppi. Ad oggi, le misure empiriche per migliorare il livello di biosicurezza si sono dimostrate ampiamente inefficaci. L'epidemiologia molecolare sta ora cercando di identificare le potenziali sorgenti d'infezione e le modalità di diffusione nei gruppi infetti, cosa che permetterà di meglio indirizzare e definire le misure di controllo più appropriate. Inoltre, i medesimi studi stanno fornendo anche significativi dati sulla patofisiologia del microrganismo, quali la sua capacità di sopravvivere in condizioni e ambienti avversi. Queste informazioni, una volta correlate a studi post-genomici, permetteranno di sviluppare e mettere in atto delle strategie complementari di intervento quali vaccini, probiotici e decontaminazione.

Bibliografia

1. Ayling, R.D., Woodward, M.J., Evans, S. & Newell, D.G. (1996). Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. *Res Vet Sci*, 60, 168-72.
2. Doig, P., Kinsella, N., Guerry, P. & Trust, T.J. (1996). Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol Microbiol*, 19, 379-87.
3. Duim, B., Wassenaar, T.M., Rigger, A. & Wagenaar, J. (1999). High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl Environ Microbiol*, 65, 2369-75.
4. Frost, J.A., Oza, A.N., Thwaites, R.T. & Rowe, B. (1998). Serotyping scheme for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on direct agglutination of heat-stable antigens. *J Clin Microbiol*, 36, 335-9.
5. Harrington, C.S., Thomson-Carter, F.M. & Carter, P.E. (1997). Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implications for the flagellin gene typing scheme. *J Clin Microbiol*, 35, 2386-92.
6. Karlyshev, A.V., Linton, D., Gregson, N.A., Lastovica, A.J. & Wren, B.W. (2000). Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Mol Microbiol*, 35, 529-41.
7. Kokotovic, B. & On, S.L. (1999). High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiol Lett*, 173, 77-84.
8. Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, L.J. & Gill, P. (1982). Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol*, 15, 761-8.
9. Nachamkin, I., Bohachick, K. & Patton, C.M. (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 31, 1531-6.
10. Newell, D.G., Frost, J.A., Duim, B., Wagenaar, J.A., Madden, R.H., van der Plas, J. & On, S.L.W. (2000). New developments in the subtyping of *Campylobacter* species. In *Campylobacter jejuni 2nd edition*, Nachamkin, I. & Blaser, M.J. (eds) pp. 27-44. ASM Press: Washington DC.
11. Penner, J.L. & Hennessy, J.N. (1980). Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat-stable antigens. *J Clin Microbiol*, 12, 732-7.

12. Shreeve, J.E., Toszeghy, M., Pattison, M. & Newell, D.G. (2000). Sequential spread of *Campylobacter* infection in a multi-pen broiler house. *Avian Diseases*, in press.
13. Tompkins, D.S., Hudson, M.J., Smith, H., Brett, M.M., Owen, R.J., Brazier, J.S., Cumberland, P., King, V. & Cook, P.E. (1999). A study of intestinal infectious disease in England: microbiological findings in cases and controls. *Communicable disease and public health*, 2, 108-113.
14. Toszeghy, M., Shreeve, J., Ridley, A., Mead, G., Wagenaar, J.A. & Newell, D.G. (2000). *Campylobacter* infection associated with exposure to a poultry abattoir environment. *Epidemiology and infection*, submitted for publication.
15. Wassenaar, T.M. & Newell, D.G. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol*, 66, 1-9.
16. Wassenaar, T.M., Geilhausen, B. & Newell, D.G. (1998). Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1816-21.
17. Yan, W., Chang, N. & Taylor, D.E. (1991). Pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genomic DNA and its epidemiologic application. *J Infect Dis*, 163, 1068-72.

Tabella 1: Confronto fra i vari metodi di genotipizzazione e sierotipizzazione per la sottotipizzazione dei campylobatteri (modificata da Wassenaar and Newell, 10)

Table 1: Comparison of various genotyping methods and serotyping for the subtyping of *Campylobacters* (modified from Wassenaar and Newell, 10)

Metodo	Capacità discriminatoria ¹	Capacità di tipizzazione	Riproducibilità ²	Velocità di esecuzione	Costo	Reperibilità
Fla-tipizzazione	discreta	100%	buona	<1 giorno	basso	buona
PFGE	buona	100%	buona	2-3 d	medio	limitata
Ribotipizzazione	scarsa	100%	buona	3-4 d	medio	limitata
-automatizzata	buona	N. Av.	buona	8 h	alto	limitata
RAPD	sufficiente	±80%	bassa	<1 d	basso	buona
AFLP	buona	100%	buona	3-4 d	medio	limitata
sequenziamento	molto buona	100%	buona	2-3 d	medio	limitata
sierotipizzazione	sufficiente	±80%	buona ³	<1 d	basso	limitata

1) La capacità discriminatoria di un metodo è la sua abilità di differenziare tra ceppi geneticamente non correlati

2) La riproducibilità di un metodo determina la sua capacità a identificare campioni eseguiti in doppio. Questo è indipendente da fattori esterni quali l'instabilità genetica.

3) Una debole cross-relazione serologica può complicare l'interpretazione dei dati. Passaggi multipli potrebbero essere necessari per esprimere pienamente gli antigeni.

N.Av.= non disponibile. N.A.= non applicabile

RELAZIONE 2

ASPETTI EPIDEMIOLOGICI DELLE INFEZIONI DA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* NEGLI ALLEVAMENTI DI POLLAME

Di Modugno G, Camarda A., Circella E., Ficarella V.

Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali – Sezione di Patologia Aviaria. Facoltà di Medicina Veterinaria. Viale Caduti di Tutte le Guerre 1, 70126 Bari.

Parole chiave: epidemiologia, *Campylobacter jejuni*, pollame,

Epidemiological characteristics of *Campylobacter jejuni* infections in poultry

Key words: epidemiology, *Campylobacter jejuni*, poultry

Le tossinfezioni indotte da *Campylobacter jejuni* vengono segnalate con frequenza sempre maggiore in tutto il mondo. I casi stimati spesso raggiungono e addirittura superano le segnalazioni di tossinfezioni da *Salmonella* spp. (Comi et al., 1984; Euzéby, 1993). Negli Stati Uniti d'America ogni anno si verificano approssimativamente 4 milioni di casi di tossinfezione da *Campylobacter jejuni* (Altekruse et al., 1998). In Gran Bretagna la Campylobacteriosi, è ritenuta la principale causa delle diarree di origine infettiva (Euzéby, 1993). In Danimarca il germe è stato isolato dal 94% dei casi di enterite acuta (Nielsen et al., 1997). L'infezione è molto frequente anche in Italia dove sono stati identificati portatori sani e segnalati numerosi casi di malattia, specialmente nei bambini dell'età di 1-4 anni e nei giovani tra i 15 ed i 24 anni (Piro, 1989; Manzano et al., 1994).

In Toscana nel periodo compreso tra il 1981 e il 1990, esami batteriologici effettuati da campioni di feci di 6.403 pazienti, di età inferiore ai 14 anni, affetti da gastroenterite, è stato individuato *Campylobacter* nel 10,8% (86,1% *C. jejuni*, 13,9% *C. coli*) dei casi, mentre *Salmonella*, *Aeromonas*, e *Yersinia enterocolitica*, sono state isolate rispettivamente nel 8,4%, 1,4% e 0,3% dei campioni; *Shigella* spp. è stata evidenziata solo occasionalmente (Figura et al., 1997). Studi epidemiologici analoghi condotti da vari Autori (Varoli et al., 1991) nel Nord Italia hanno confermato tali osservazioni ed indicano il *C. jejuni* come la specie responsabile della maggior parte delle enteriti da *Campylobacter* in tale zona.

Le patologie extra-digestive ascrivibili al *Campylobacter* sono meno frequenti e sono rappresentate di solito dalla sindrome uremico-

emolitica, dalla polineurite post-infettiva, dall'artrite reattiva e dalla sindrome di Reiter, etc (Guerrant, 1997). Recentemente è stata ipotizzata un'implicazione eziologica del *C. jejuni* nell'insorgenza della sindrome di Guillain-Barré, neuropatia caratterizzata da paralisi neuro-muscolare flaccida acuta.

Studi recenti su detta sindrome hanno evidenziato, infatti, una stretta correlazione fra l'isolamento del *C. jejuni* e la comparsa della patologia (Guerrant, 1997; Altekruuse et al., 1998), tanto da orientare la ricerca verso la formulazione di un vaccino, peraltro ancora in via di sperimentazione.

Le ricerche epidemiologiche in Italia risultano nel complesso frammentarie e non definiscono un quadro organico della reale incidenza dell'infezione sul territorio, in parte a causa delle difficoltà nella coltivazione del germe, e della lunga e laboriosa procedura che rende non routinario il suo isolamento nelle strutture ospedaliere e nei laboratori microbiologici.

L'infezione da *C. jejuni* può essere contratta per contatto diretto con diverse specie di animali infetti (pollame, bovini, ovini e suini). Anche animali d'affezione, quali cani, gatti e uccelli (*pet birds*) possono rappresentare ulteriori serbatoi del germe e contribuire alla diffusione dell'infezione.

Risultano quindi inevitabilmente più esposte a rischio di infezione categorie professionali, quali veterinari e personale addetto al governo degli animali negli allevamenti, personale impegnato nelle strutture di macellazione, o nei reparti di vendita (Cantoni, 1994; Jacobs-Reitsma, 1994b; Istre et al., 1984).

Più frequentemente però, l'infezione avviene per via alimentare, a seguito dell'assunzione di latte non pastorizzato, di acqua contaminata, di torte gelato, frutta, insalata, molluschi e prodotti carnei contaminati (Federighi e Cappelier 1995; Guerrant, 1997; Butzler e Oosterom, 1991); tuttavia la quasi totalità dei casi clinici consegue principalmente al consumo di carni poco cotte (SKirrow, 1990; Hopkins e Scott, 1983; Osterom et al., 1983; Harris et al., 1986; Deming et al., 1987; Griffiths, Park, 1990; Euzeby, 1993; Jacobs-Reitsma, 1997; Altekruuse et al., 1998), ed in particolare di carni di pollo, che vengono indicate come la fonte più importante di trasmissione del *C. jejuni* all'uomo (Blaser 1997; Blaser et al., 1982; Morris et al., 1982; Sevoian e Calnek, 1959).

Ricerche epidemiologiche condotte in allevamenti di broilers nei Paesi Bassi hanno evidenziato una positività batteriologica nei confronti del *Campylobacter jejuni* del 57% dei gruppi contaminati (Giessen et al. 1996); in altri casi la percentuale di flocks positivi è risultata pari a 82% (Jacobs-Reitsma et al., 1994).

Studi condotti negli Stati Uniti hanno riscontrato la presenza di *C. jejuni* nel 88,2% dei soggetti esaminati (James e Kaplan 1998). In Gran Bretagna, il 68% dei flocks al momento della macellazione è risultato infetto (Humphrey, 1994). In Svezia è stata recentemente riscontrata un'incidenza del 27% (Berndtson et al., 1996).

Indagini riferite all'Italia hanno confermato la diffusione dell'infezione anche negli allevamenti di polli da carne distribuiti sul nostro territorio (Di Modugno et al., 1996). Dai risultati delle ricerche, la percentuale di positività dei flocks risulta piuttosto elevata, pari al

75% (Tabella 1). Recenti ricerche hanno dimostrato che il germe è diffuso in maniera altrettanto rilevante anche nelle ovaiole in deposizione (Jacobs-Reitsma et al., 1994; Di Modugno et al., 1997b). Da indagini microbiologiche da noi condotte in allevamenti di ovaiole per la produzione di uova da consumo è emersa una percentuale di positività dei flocks pari all'85,71%, con una percentuale di isolamento del germe nei singoli gruppi variabile dal 26,6% al 73,3% (Tabella 2). Nonostante la notevole incidenza dell'infezione negli allevamenti avicoli (sia di broilers che di ovaiole), le modalità di diffusione del *Campylobacter jejuni* non sono ancora completamente chiarite.

Sembrerebbe che il germe, una volta penetrato in allevamento, diffonda nei flocks per via orizzontale a macchia d'olio (Oosterom et al., 1983; Lindblom et al., 1986; Annan-Prah et al., 1988; Jacobs-Reitsma, 1997).

Nonostante *Campylobacter jejuni* sia un germe notoriamente poco resistente nell'ambiente (Euzeby 1993), prove preliminari di contaminazione sperimentale delle feci da noi effettuate hanno evidenziato che *C. jejuni* protetto da materiale organico può essere reisolato dopo 72 h a temperatura ambiente, permettendo quindi che si compia il ciclo di infezione oro-fecale (Tabella 3). Secondo Blaser et al. (1980), la sopravvivenza di *C. jejuni* nelle feci si protrae a 4°C per tre settimane.

Ricerche condotte da Buswell (1998) volte allo studio della capacità di persistenza di *C. jejuni* nell'acqua hanno evidenziato la presenza del germe rispettivamente dopo 28 e 42 giorni, a temperature di conservazione di 30°C e 4°C. Secondo Pearson (1993) l'acqua somministrata agli animali potrebbe rappresentare una delle principali fonti di introduzione di *C. jejuni* nell'allevamento. Anche altri AA ritengono allo stesso modo che l'acqua di approvvigionamento, soprattutto se non sottoposta a trattamenti, possa costituire uno dei principali fattori di rischio d'introduzione del germe nei flocks (Kapperud et al. 1993; Van de Giessen et al., 1996; Gregory et al., 1997).

Da ricerche da noi effettuate in 12 flocks di broilers di n.7 allevamenti diversi (per un totale di 224.000 animali allevati), sembrerebbe emergere che l'acqua, come anche il mangime e la lettiera, fungano da elementi di propagazione dell'infezione in allevamento piuttosto che rappresentare mezzi di introduzione del germe nei gruppi (Di Modugno et al., 1996).

Campioni di acqua, mangime e lettiera infatti, sono risultati costantemente negativi quando prelevati rispettivamente da vasche, silos e balle di lettiera nuove, prima quindi del loro ingresso nei capannoni.

La presenza del germe è stata invece in essi evidenziata durante il ciclo produttivo, ed in maniera che sembrerebbe correlata alla positività batteriologica degli animali.

I broilers sono risultati infetti a partire da circa 30 gg di età con una percentuale media di isolamento del 26,3%. Tale percentuale si innalzava al 43,9% a 37-46 gg di età e raggiungeva il 57,69%, con un picco dell'80% in un solo flock, a 52-55 gg (Tabella 4), aumentando quindi in maniera proporzionale durante le fasi del ciclo produttivo (Figura 1) (Di Modugno et al., 1996). Analoga progressione dell'infezione è stata

evidenziata in allevamenti di broilers da Achen et al. (1998).

Allo stesso modo i tamponi ambientali, la lettiera, il mangime prelevato dalle mangiatoie e l'acqua degli abbeveratoi sono risultati positivi dal 30°C giorno in poi, con percentuali medie di isolamento pari rispettivamente al 14,7%, al 46,6%, al 4,3% ed al 30,4% (Tabella 5).

Si ribadisce pertanto che le citate fonti non costituiscono veicoli di introduzione abituale di *C. jejuni* in allevamento, ma che più verosimilmente siano causa di propagazione del germe all'interno dei flocks a seguito della loro contaminazione attraverso le feci.

Da nostre ricerche (Di Modugno et al., 1997), sembrerebbe che un ruolo epidemiologico di notevole importanza nella introduzione e diffusione del germe nei capannoni sia svolto dall'uomo. Infatti i tamponi effettuati dalle mani e dalle scarpe degli operai sono risultati contaminati con una percentuale media rispettivamente del 15,38% e 10,5% (Tabella 6).

Tali percentuali giustificano l'ipotesi di una contaminazione crociata tra capannoni e veicolata dall'uomo. La circolazione non controllata nell'azienda, soprattutto se si tiene conto dei liberi movimenti nell'allevamento del personale addetto al governo degli animali e talora l'inosservanza delle più elementari norme di profilassi igienico-sanitaria, quali la mancanza di vaschette con disinfettante all'ingresso dei capannoni, l'uso non routinario di camici e sovrascarpe, ecc... favoriscono la propagazione del germe (Di Modugno et al. 1996)

Un ruolo importante verrebbe svolto anche da altri vettori animati (roditori, insetti ed animali domestici ed uccelli selvatici) e/o inanimati (Van de Giessen et al., 1992; Kazwala et al., 1990; Hoop et Ehsam, 1987; Annah-Prah et Janc, 1988).

Il mancato isolamento di *C. jejuni* dai pulcini di un giorno fino all'età di 4 settimane (Tabella 7), confermerebbe inoltre che l'infezione sarebbe acquisita nell'ambiente interno ai capannoni, piuttosto che per la via verticale.

Secondo alcuni AA, tuttavia, l'intervento di fattori fisiologici, immunitari (immunità materna), o dietetici (Neill et al., 1984), ritarderebbe il riscontro dell'infezione tra i giovani animali. Secondo altri (Pokamunski et al., 1986), le tecniche di isolamento attualmente adottate non sarebbero in grado di evidenziare il microorganismo, qualora la sua presenza fosse al di sotto di un certo limite di svelabilità.

I risultati di infezioni sperimentali effettuate in pulcini di 1 gg. per via orale sembrano smentire tali teorie: i soggetti vengono facilmente colonizzati da *Campylobacter jejuni* ed il germe può essere facilmente reisolato già due giorni dopo il challenge, anche nei casi in cui le dosi infettanti utilizzate siano basse (Shanker et al., 1990).

L'ipotesi di una trasmissione verticale dell'infezione, e quindi di un possibile passaggio del germe nelle uova ed al pulcino attraverso questa via appare, tuttavia, controversa. Gran parte degli Autori (Oosterom et al., 1983; Lindblom et al., 1986; Annan-Prah et al., 1988; Jacobs-Reitsma, 1997) la ritiene improbabile.

Questi infatti non sono mai riusciti ad isolare il *C. jejuni* negli incubatoi, né da pulcini appena schiusi. Altri invece (Pearson et al. 1996; Achen et al. 1998; Cox et al., 1999) ammettono la possibilità di un'infezione del pulcino attraverso l'uovo.

Indagini microbiologiche da noi effettuate su n.112 galline ovaiole, allevate in batteria, provenienti da n.10 allevamenti diversi, hanno rilevato la frequente contaminazione da *C. jejuni* dell'apparato riproduttore (Tabella 7). Tale contaminazione sembrerebbe, da quanto emerso dalle nostre ricerche, strettamente correlata alla presenza del germe nell'intestino degli animali. Tutte le ovaiole testate, infatti, che hanno presentato contaminazione dell'ovidutto, sono risultate costantemente colonizzate da *Campylobacter jejuni* a livello intestinale, fatta eccezione per n. 3 soggetti, da cui il germe è stato isolato unicamente dall'ovidutto e non dalle feci.

La frequenza percentuale di isolamento di *Campylobacter jejuni* dai 5 tratti dell'ovidutto delle ovaiole, è apparsa decrescere progressivamente, partendo dalla vagina (78,69%) e risalendo fino all'infundibulo (54,10%) (Tabella 8).

Le ricerche batteriologiche eseguite sull'ovaio hanno consentito l'isolamento del germe da n.7 ovaiole (11,67%) su n.60 esaminate (Tabella 9).

Nessuno dei campioni di milza e di sangue del cuore esaminati era positivo per *Campylobacter jejuni* (Tabella 9). Sono risultati contaminati n. 3 dei 41 (7,32%) campioni di fegato prelevati da soggetti che sono risultati infetti sia a livello intestinale che dell'ovidutto. Tali animali non presentavano alcuna lesione macroscopica.

I risultati delle ricerche pertanto indurrebbero a supporre che una possibile fonte di inquinamento del tratto genitale possa essere rappresentata dalle feci infette, le quali assumerebbero il ruolo di veicolo del germe, dal momento che lo sbocco delle vie digerenti e delle vie genitali avviene in un unico organo (cloaca), in distretti distinti ma contigui. *Campylobacter jejuni*, pertanto, partendo dalla vagina, risalirebbe l'ovidutto, contaminandolo per via ascendente, fino a raggiungere l'ovaio.

Questa ipotesi sembrerebbe confermata dalla frequenza di isolamento di *Campylobacter jejuni* dall'apparato riproduttore: più elevata nella vagina, decrescente in maniera progressiva nei tratti successivi dell'ovidutto e notevolmente ridotta a livello dell'ovaio. La mancanza di una stretta continuità tra ovidutto ed ovaio potrebbe spiegare, in parte, la scarsa positività riscontrata a livello di quest'organo. Lo scarso riscontro di *Campylobacter jejuni* negli organi (fegato, milza e sangue del cuore) sembrerebbe confermare che il germe più raramente possa raggiungere l'apparato riproduttore per via ematica o linfatica.

Cox et al. (1999) ritengono probabile la trasmissione verticale dell'infezione, in seguito alla caratterizzazione degli isolati, che ha evidenziato una corrispondenza genetica tra i ceppi isolati da flocks di riproduttori e *C. jejuni* che infettavano la progenie.

Prove sperimentali condotte su pulcini di un giorno, infettati per via orale con due ceppi diversi di *C. jejuni*, nella quantità di 10^5 microrganismi, hanno evidenziato una diversa capacità dei germi di colonizzare le cellule dell'epitelio intestinale (Meinersmann et al., 1991).

La localizzazione del *Campylobacter jejuni* nell'intestino avviene preferenzialmente a livello della regione dei ciechi, dove la concentrazione batterica risulta più elevata rispetto agli altri tratti intestinali e raggiunge quantità pari a 10^4 - 10^7 germi per grammo (Beery et al., 1988). E' possibile tuttavia anche la

colonizzazione del digiuno e della cloaca (Shane et al., 1992).

La colonizzazione intestinale non induce generalmente malattia clinicamente manifesta, ma rappresenta un alto rischio di contaminazione per i prodotti avicoli (carni ed uova) destinati al consumo.

Infatti, durante la macellazione, ed in particolare modo nella fase di eviscerazione, la rottura dell'intestino può facilmente comportare la contaminazione di carcasse e visceri (Oosterom et al., 1983; Comi et al., 1984; Lo Schiavo et al., 1991).

In precedenti ricerche (Di Modugno et al., 1986) abbiamo evidenziato che ad un alto numero di isolamenti del germe da contenuto intestinale, corrispondeva un altrettanto elevato riscontro sulle carcasse (Tabella 10). La successiva biotipizzazione (secondo Herbert, 1982) di 50 ceppi di *Campylobacter jejuni* evidenziava che i biotipi isolati dal contenuto intestinale erano per lo più identici a quelli isolati dalle carcasse degli animali appartenenti allo stesso gruppo (Tabella 11).

Alla colonizzazione intestinale e quindi alla conseguente diffusione del germe nell'ambiente di allevamento può far seguito inoltre la contaminazione di cute e piumaggio che, nella catena di macellazione, potrebbe rappresentare un ulteriore elemento di rischio per la contaminazione delle carni, come risulta dalle ricerche da noi condotte su n.9 flocks di broilers al momento della macellazione.

Tutti i gruppi esaminati infatti sono risultati contaminati da *Campylobacter jejuni* a livello intestinale: la positività media dei ciechi è stata pari al 36,55% con un range variabile dal 20 al 60%. Il germe inoltre è risultato presente su cute e piumaggio in tutti i gruppi testati sebbene in percentuali variabili, comprese tra il 5 ed il 90% (Tabella 12). La contaminazione cutanea ha assunto valori di positività rilevanti e in alcuni casi addirittura superiori a quelli del cieco, in particolare in 2 dei 4 flock in cui è stato possibile effettuare contemporaneamente entrambe le valutazioni (Tabella 12).

La contaminazione del piumaggio e della cute pertanto, specie se in alte percentuali, potrebbe non solo contribuire ad inquinare le carcasse, ma anche l'intera catena di macellazione, che a sua volta potrebbe favorire la diffusione del germe anche a partite originariamente non infette.

Le percentuali di isolamenti di *Campylobacter jejuni* riscontrate sulle carni avicole al commercio in diversi Paesi sono piuttosto rilevanti: 36% in Danimarca (Nielsen et al., 1997); 25,6% in Belgio (Uyttendaele et al., 1999) e 27,9% in Germania (Atanassova et al., 1998).

Ricerche condotte in Italia hanno evidenziato la presenza di *Campylobacter* termofili in percentuale pari a 37,5%; tra questi la specie più comune è risultata *C. jejuni* (80%) (Zanetti et al., 1996).

Negli impianti di sezionamento, le percentuali di contaminazione dei campioni risultano addirittura superiori: 61% nei Paesi Bassi (Hahne et al., 1990); 38% in Irlanda (Madden et al., 1998); 40% in Belgio (Uyttendaele et al., 1999). Questi dati indurrebbero a ritenere che si possa verificare un'amplificazione delle contaminazioni a seguito di un inquinamento delle catene di lavorazione e di un mancato rispetto di norme igieniche (riutilizzo di strumenti non puliti, mancato lavaggio delle mani degli operai, ecc...).

La contaminazione delle carcasse e delle carni avicole è fondamentalmente superficiale e la sopravvivenza del germe è correlata alla temperatura di conservazione. Stern (1995) precisa che il numero di germi diminuisce sensibilmente dopo un periodo di conservazione di 10 giorni a 4°C. Shane (1998) afferma che alla temperatura di -12°C *C. jejuni* sopravvive per un periodo di almeno 10 giorni prolungandosi tuttavia fino a 182 giorni alla temperatura di conservazione di -20°C. La temperatura di conservazione influenza la persistenza del germe anche sul guscio delle uova (Hanninen et al. 1984).

In ricerche da noi effettuate sull'inquinamento sperimentale del guscio con una sospensione batterica di 10⁴, la sopravvivenza di *C. jejuni* è risultata decrescente nel tempo, ma sicuramente più prolungata alla temperatura di 4°C (almeno 36 h) rispetto alla temperatura ambiente (almeno 24 h). Panebianco et al. (1992) in indagini effettuate sul guscio di 711 uova del commercio, non hanno mai isolato *C. jejuni*.

Nostre indagini evidenziano che la presenza del germe sulle uova sembra influenzata in maniera sostanziale dall'imbrattamento del guscio con le feci. (Tabella 13). Le uova infatti sono risultate contaminate in maniera proporzionale al grado di inquinamento del guscio, secondo un range decrescente dal 22,2% per le uova molto sporche al 2,5% per quelle apparentemente pulite.

Indagini microbiologiche da noi eseguite evidenziano, a tal proposito, una stretta correlazione tra la presenza del microorganismo nel contenuto intestinale ed il riscontro del germe nell'ovidutto e contemporaneamente sul guscio delle uova deposte. Viceversa, quando il germe risulta assente nel contenuto intestinale, non lo si riscontra neppure nell'ovidutto e sul guscio (Tabella 14).

Non si può escludere che *C. jejuni* attraverso i pori possa inquinare il contenuto dell'uovo. Finch e Blake (1985) riportarono un focolaio di tossinfezione alimentare, in Minnesota, determinato dal consumo di uova poco cotte.

Tale evenienza appare tuttavia occasionale considerate anche le capacità antibatteriche del contenuto dell'uovo (Hanninen et al. 1984).

E' opportuno inoltre precisare che non sarebbe realistico attribuire un eguale significato epidemiologico a tutti i ceppi di *C. jejuni* isolati dagli animali o dagli alimenti di origine animale (Stern et al. 1984).

Allo scopo, risulta utile l'approfondimento degli studi sulle caratteristiche differenziali tra i ceppi batterici isolati.

La biotipizzazione da noi eseguita secondo lo schema di Lior (1984) su n.55 ceppi di *C. jejuni* isolati in 6 allevamenti diversi di galline ovaiole, rispettivamente da contenuto intestinale (n.36 ceppi), ovidutto (n.12 ceppi) e uova deposte (n.7 ceppi) sembrerebbe evidenziare una stretta correlazione tra gli stipti isolati nell'ovidutto e sulla superficie delle uova e quelli di origine intestinale.

Le prove eseguite hanno evidenziato, innanzi tutto, un'alta prevalenza del biotipo I (50,91%) e del biotipo II (47,27%), mentre si è dimostrato sporadico il biotipo III (1,81%) e completamente assente il biotipo IV (Tabella 15).

Il biotipo I era presente in alte percentuali contemporaneamente nelle feci (52,77%), nell'ovidutto (50,00%) e sul guscio delle uova deposte (42,85%); risultati simili sono stati osservati anche per il biotipo II con percentuali di positività rispettivamente del 44,44%, 50,00% e 57,14% da feci, ovidutto e superficie delle uova (Tabella 16).

La prevalenza dei biotipi I e II, evidenziata sia negli animali che sulle uova, ed in particolare del biotipo I, sembrerebbe assumere particolare interesse in quanto gli stessi biotipi risultano frequentemente isolati da pazienti umani affetti da enterite (Varoli et al., 1991; Luzzi, 1998, com.pers., Figura et al., 1997).

Tuttavia, la biotipizzazione appare come una tecnica dotata di limitata capacità discriminante, che consente solo una parziale caratterizzazione dei ceppi testati. Allo stesso biotipo, infatti, possono corrispondere tipi genetici differenti, come evidenzia il ricorso a tecniche di tipizzazione genetica, quali la PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorfism) dei ceppi di *Campylobacter jejuni* isolati (Di Modugno et al., 1999) (Tabella 17).

Ulteriori ricerche (Camarda et al., 2000), effettuate mediante PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polimorfism*) e PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresys*), hanno evidenziato che diversi tipi di *Campylobacter* potevano essere presenti nello stesso allevamento e perfino sullo stesso animale. Di particolare interesse il fatto che i *Campylobacter jejuni* riscontrati a livello intestinale potevano presentare gli stessi profili genetici di quelli che colonizzavano l'ovidutto; a volte, tuttavia, *Campylobacter* isolati dall'apparato riproduttore presentavano caratteristiche genotipiche diverse da quelle dei germi riscontrati a livello intestinale.

Le citate differenze genetiche propongono notevoli interrogativi; è, infatti, ragionevole ipotizzare che ad un diverso profilo genetico potrebbe non corrispondere un uguale comportamento biologico.

Negli ultimi anni sono risultate sempre più frequenti in vari Paesi Europei le segnalazioni relative all'isolamento, in percentuale crescente, da pazienti umani di ceppi di *Campylobacter jejuni* antibiotico-resistenti (Endtz et al., 1991; Reina et al., 1992) verso antimicrobici correntemente impiegati anche in avicoltura, in particolare chinoloni di vecchia e nuova generazione, tetracicline ed eritromicina. Quest'ultimo viene spesso considerato il farmaco di elezione nella terapia delle *Campylobacteriosi* umane (Endtz et al., 1991).

I tests di sensibilità agli antimicrobici, che sono stati da noi effettuati su n.55 ceppi isolati da galline ovaiole (Tabella 18), confermano le resistenze già note di *C. jejuni* alla cefalotina ed alla associazione trimetoprim-sulfamidico, e manifestano una significativa resistenza nei confronti di acido nalidixico (43,43%) e dei chinoloni di nuova generazione (enrofloxacin e flumequine), che hanno mostrato percentuali di resistenza tra loro sovrapponibili (30,90%).

Resistenza elevata è stata riscontrata nei confronti dell'ampicillina (94,54%), ma abbastanza contenuta per l'amoxicillina.

Tra gli aminoglicosidi esaminati, la più alta percentuale di resistenza è stata rilevata nei confronti della gentamicina (23,63%).

Per i macrolidi presi in esame, eritromicina e spiramicina, i risultati sono sovrapponibili: il 14,54% dei ceppi testati sono risultati resistenti ad entrambi gli antibiotici.

Più basse appaiono le percentuali di resistenza nei confronti di tetraciclina (12,72%), tilmicosina (8,33%) e colistina (7,27%).

Conclusioni

Nonostante le numerose ricerche sull'argomento, molti aspetti dell'epidemiologia dell'infezione da *Campylobacter jejuni* sono ancora poco noti e necessitano di ulteriori approfondimenti. Le difficoltà incontrate nella messa a punto di tecniche efficaci di coltivazione del germe, peraltro oggi in gran parte superate, hanno rallentato e frammentato le ricerche privandole del giusto coordinamento tra il campo umano e quello veterinario.

Le ricerche fino ad ora condotte hanno evidenziato che il germe può essere riscontrato sia sulle carcasse di pollame che sulla superficie del guscio delle uova. Queste ultime sembrano giocare un ruolo secondario come fonte di infezione per l'uomo. Tuttavia, necessitano adeguati approfondimenti epidemiologici che non potranno prescindere dalla caratterizzazione, a tutt'oggi ancora carente, dei ceppi di *Campylobacter* isolati dall'uomo e dagli animali, in particolare dal pollame.

Le tecniche utilizzate, quali ad esempio la tipizzazione fagica, la biotipizzazione di Herbert (Herbert et al., 1982) e di Lior (1984), appaiono limitate e non esaustive consentendo una classificazione solo parziale dei ceppi isolati (Di Modugno et al., 1988., Di Modugno et al., 1999). Queste tecniche, peraltro, forniscono risultati non correlabili alla sierotipizzazione, che, a sua volta non consente la classificazione precisa di tutti i ceppi testati (Frost et al., 1998).

Il ricorso alla tipizzazione genetica offre in questo senso delle maggiori opportunità; è importante tuttavia, considerare che molto spesso la mancanza di una standardizzazione delle metodiche porta i diversi laboratori a risultati non confrontabili. Inoltre, alcune di queste tecniche, quali ad esempio la PCR-RFLP, a volte individuano una eccessiva variabilità all'interno delle popolazioni di *Campylobacter* e non facilitano una suddivisione e classificazione degli stipti.

Sembrano tuttavia delinearsi popolazioni di *Campylobacter jejuni* che colonizzano prevalentemente una specie animale (bovino, suino, pollame, uomo, ecc.). Complica il quadro una accertata variabilità genetica del germe che determinerebbe la formazione di sub popolazioni a partire da diversi tipi genetici (Wassenaar et al., 2000). In conclusione, ad un singolo profilo non corrisponde necessariamente uno stesso componente biologico dello stipte batterico considerato, poiché possono rilevarsi germi (Federighi et Cappellier, 1998) con diversa capacità di colonizzazione, adesione, invasività, produzione di tossine (enterotossine e citotossine), di emolisine, ecc., e anche con diverso potere patogeno.

Tabella 1: Presenza di *Campylobacter jejuni* in gruppi di broilers ed ovaiole In Italia Meridionale
Table 1: Presence of *Campylobacter jejuni* among broiler flocks in Southern Italy

	Flocks esaminati		Flocks positivi		Flocks negativi	
	N.	%	N	%	N	%
Broilers	12	100	9	75,00	3*	25
Ovaiole	14	100	12	85,71	2	14,29

* Gruppi riscontrati indenni da *Campylobacter jejuni* per l'intero ciclo produttivo

Tabella 2: Isolamento di *C. jejuni* da tamponi cloacali in 14 flock di galline ovaiole
Table 2: Isolation of *Campylobacter jejuni* from cloacal swab taken in 14 flock of light layers

Flock N°	Tamponi cloacali		
	Effettuati n.	Positivi n.	% di Positività
1	26	18	69,23
2	30	15	50
3	31	10	32,25
4	2	1	50
5	30	18	60
6	30	22	73,3
7	30	16	53,3
8	30	16	53,3
9	30	18	60
10	30	13	43,3
11	30	8	26,6
12	30	8	26,6
13	30	0	0
14	30	0	0
Totale	389	163	41,9

Tabella 3: Sopravvivenza di *Campylobacter jejuni* su feci di pollo inquinate sperimentalmente e tenute a temperatura ambiente. Risultati preliminari

Table 3: Surviving of experimentally added *Campylobacter jejuni* on chicken faeces, conserved at room temperature

Tempo di contatto (h)	Campioni testati	Campioni positivi	% di positività
3	9	9	100
6	9	7	77,7
12	9	9	100
24	9	5	55,5
48	9	4	44,4
72	9	1	11,1

Tabella 4: Isolamenti di *Campylobacter jejuni* da tamponi ciecali e cloacali di broilers
Table 4: Isolation of *Campylobacter jejuni* from cloacal swabs of broilers

Età (gg)	Campioni		
	N.	Positivi	% Positività
0 - 28	118	0	0
29 - 36	19	5	26,32
37 - 46	41	18	43,90
52 - 55	26	15	57,69
Totale	204	38	18,62

Tabella 5: Isolamenti di *Campylobacter jejuni* in gruppi di broilers risultati contaminati durante il ciclo di allevamento

Table 5: Isolation of *Campylobacter jejuni* from broiler flock contaminated in the unit during rearing

	Età degli animali (giorni)					
	0-28			29-55		
Campioni prelevati da:	N. campioni.	N.campioni positivi	% di positività.	N. campioni.	N.campioni positivi	% di positività.
Personale	18	0	0	32	4	12,5
Ambiente*	92	0	0	95	14	14,7
Mangime da:						
- Mangiatoie	15	0	0	23	1	4,3
- silos	7	0	0	7	0	0
Acqua da:						
- abbeveratoi	13	0	0	23	7	30,4
- vasche	10	0	0	6	0	0
Lettiera	19	0	0	30	14	46,6
Tamponi cloacali e ciecali	118	0	0	86	38	44,1
Totale	292	0	0	313	78	24,9

* Campioni prelevati da: pavimento all'ingresso del capannone, pareti, finestre e ventilatori

Tabella 6: Isolamenti di *Campylobacter jejuni* da personale addetto al governo degli animali

Table 6: Isolation of *Campylobacter jejuni* from farm personnel

Campioni	N. esaminati	% di positività
Scarpe	19	10,5
Mani	13	15,4
Totale	32	12,5

Tabella 7: Isolamento di *Campylobacter jejuni* da intestino ed ovidutto di ovaiole in deposizione

Table 7: Isolation of *Campylobacter jejuni* from gut and oviduct of layers

	N. Animali Testati	Animali positivi			
		Contenuto ciecale		Ovidutto	
		N.	%	N.	%
Totale	112	89	79,46	61	54,46

Tabella 8: Isolamento di *Campylobacter jejuni* dai 5 tratti dell'ovidutto di ovaiole in deposizione

Table 8: Isolation of *Campylobacter jejuni* from 5 portion of oviduct from laying hens

	Campioni	
	N.	%
Infundibulum	33/61	54,10
Magnum	30/61	49,20
Istmo	35/61	57,38
Utero	38/61	62,30
Vagina	48/61	78,69

Tabella 9: Isolamento di *Campylobacter jejuni* da organi di ovaiole a fine ciclo di deposizione

Table 9: Isolation of *Campylobacter jejuni* from layers at the end of deposition

	N. campioni esaminati	N. Campioni positivi	% di Positività
Ovaio	60	7	11,7
Fegato	41	3	7,32
Milza	41	0	0
Sangue del cuore	41	0	0

Tabella 10: Isolamento di *Campylobacter jejuni* da contenuto intestinale e da carcasse di broilers alla macellazione

Table 10: Isolation of *Campylobacter jejuni* from gut content and carcasses of broiler at slaughtering

N° Campioni esaminati		% isolamento C. jejuni	
Contenuto intestinale	Tamponi carcasse	Contenuto intestinale	Tamponi carcasse
52	10	19,23	10,00
52	25	28,84	16,00
52	12	44,23	16,66
20	20	10,00	5,00
n.e.	38	n.e.	5,26

Tabella 11: Risultati della biotipizzazione secondo Herbert *et al.* (1982) di ceppi di *Campylobacter jejuni* isolati da carcasse e contenuto intestinale di broilers alla macellazione

Table 11: Results of biotyping as indicated by Herbert *et al.* (1982) of *Campylobacter jejuni* strains isolated from gut content and carcasses of broiler at slaughtering

Camp.	Biotipi di <i>Campylobacter jejuni</i> isolati da contenuto intestinale								Biotipi di <i>Campylobacter jejuni</i> isolati da carcasse							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
1	10 66,6%	4 26,6%	1 6,6%	-	-	-	4	-	2 50%	1 25%	1 25%	-	-	-	-	-
2	-	-	4 17,4%	17 69,5%	1 4,3%	-	1 4,3%	-	1 50%	-	-	1 50%	-	-	-	-
3	-	1 50%	1 50%	-	-	-	-	-	1 100%	-	-	-	-	-	-	-
4	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	1 50%	1 50%	-	-	-	-	-	-

Tabella 12: Isolamento di *Campylobacter jejuni* da campioni di cute/piumaggio e ciechi di broilers alla macellazione

Table 12: Isolation of *Campylobacter jejuni* from skin/feather and cecal samples taken from broilers at slaughtering

Flocks	Età degli animali	Cute e Piumaggio			Ciechi		
		N° campioni	N° campioni positivi	% di positività	N° campioni	N° campioni positivi	% di positività
A	40	10	1	10	8	2	25
B	43	10	9	90	5	3	60
C	50	10	6	60	10	4	40
D	90	20	1	5	10	2	20
E	46	14	5	35,7	-	-	-
F	42	-	-	-	30	12	40
G	57	-	-	-	9	4	44,44
H	60	-	-	-	10	3	30
I	80	-	-	-	11	4	36,36
Totale	40-90	64	22	34,37	93	34	36,55

Tabella 13: Isolamento di *Campylobacter jejuni* su uova a diverso grado di imbrattamento del guscio

Table 13: Isolation of *Campylobacter jejuni* from eggs showing a different level of dirty

	Totale n.	Positive n.	% di positività
Uova pulite	80	2	2,5
Uova poco sporche	90	9	10
Uova sporche	125	19	15,2
Uova molto sporche	45	10	22,2

Tabella 14: Isolamento di *C. jejuni* da tamponi cloacali e gusci di uova in 14 flock di galline ovaiole
Table 14: Isolation of *Campylobacter jejuni* from cloacal swabs and egg shell taken from 14 flocks of laying hens

Flock N	Tamponi cloacali			Uova		
	Effettuati n.	Positivi n.	% di Positività	Testate n.	Positive n.	% di Positività
1	26	18	69,23	30	4	13,3
2	30	15	50	30	3	10
3	31	10	32,25	30	0	0
4	2	1	50	20	2	10
5	30	18	60	30	13	43,3
6	30	22	73,3	30	8	26,3
7	30	16	53,3	30	4	13,3
8	30	16	53,3	30	2	6,6
9	30	18	60	10	2	20
10	30	13	43,3	10	2	20
11	30	8	26,6	-	-	-
12	30	8	26,6	30	0	0
13	30	0	0	30	0	0
14	30	0	0	30	0	0
Totale	389	163	41,9	340	40	11,76

Tabella 15: Presenza dei biotipi (secondo Lior) di *C. jejuni* in 6 allevamenti di galline ovaiole
Table 15: Presence of Biotypes (following Lior) of *Campylobacter jejuni* in 6 units of laying hens

Allevamento	n.ceppi testati	Biotipo I		Biotipo II		Biotipo III		Biotipo IV	
		n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
A	13	8	61,35	5	38,46	0	0	-	-
B	4	0	0	4	100	0	0	-	-
C	6	2	33,33	4	66,66	0	0	-	-
D	15	14	93,33	1	6,66	0	0	-	-
E	4	1	25	3	75	0	0	-	-
F	13	3	23,07	9	69,43	1	7,69	-	-
Totale	55	28	50,91	26	47,27	1	1,81	-	-

Tabella 16: Biotipi (secondo Lior) di *C. jejuni* isolati da tamponi cloacali, cieco, ovidutto e gusci di uova in 6 allevamenti di galline ovaiole
Table 16: Biotypes (following Lior) of *Campylobacter jejuni* isolated from cloacal swab, ceecal content, oviduct and egg shell in 6 units of laying hens

Fonte	Ceppi testati	Biotipo 1		Biotipo II		Biotipo III		Biotipo IV	
		N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
Tamponi cloacali e cieco	36	19	52,77	16	44,44	1	2,77	0	0
Ovidutto	12	6	50	6	50	0	0	0	0
Uova	7	3	42,8	4	57,14	0	0	0	0
Totale	55	28	50,9	26	47,27	1	1,81	0	0

Tabella 17: Biotipi e profili di restrizione (*fla* α e *fla* β) di *C. Campylobacter. jejuni* isolati da galline ovaiole
Table 17: Biotypes and restriction analysis profiles (*fla* α e *fla* β) di *Campylobacter. Jejuni* isolated from laying hens

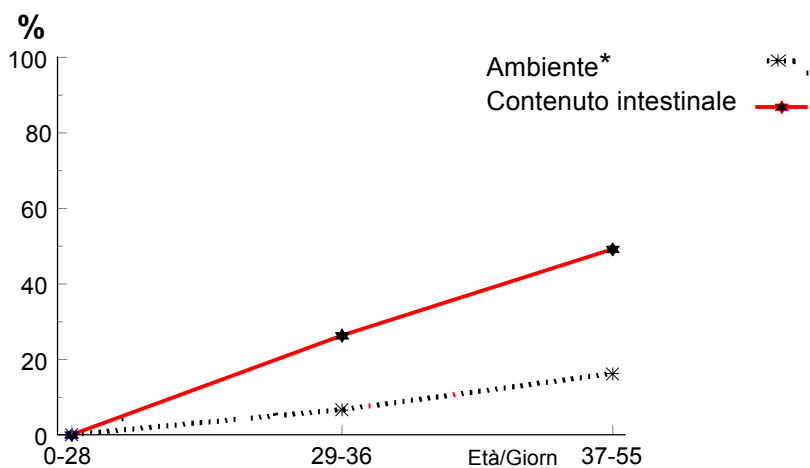
	RFLP (Hinf1/Ddel)		Biotipi (Lior)	
	N.	%	N.	%
Contenuto intestinale	6/13		II	
	7/2		II	
	1/1		II	
Ovidutto	6/13		I	
	6/13		I	
	6/13		II	
	1/1		II	
Uova	3/13		I	
	3/13		I	
	7/2		II	
	3/13		I	

Tabella 18: Antibiotico-resistenza di ceppi di *C. jejuni* isolati in n. 6 allevamenti di galline ovaiole
Table 18: Chemotherapeutic resistance of *Campylobacter jejuni* strains isolated in 6 units of laying hens

	N. Ceppi saggiati	N. Ceppi resistenti	% di resistenza
Ampicillina	55	52	94.54
Cefalotina	55	55	100
Amoxicillina	55	6	10.90
Neomicina	55	4	7.27
Kanamicina	55	5	9.09
Gentamicina	55	13	23.63
Tetraciclina	55	7	12.72
Eritromicina	55	8	14.54
Spiramicina	55	8	14.54
Colistina	55	4	7.27
Acido nalidixico	55	24	43.63
Enrofloxacin	55	17	30.90
Flumequine	55	17	30.90
Trimethoprim+Sulfamet.	55	55	100
Tilmicosina	36	3	8.33

Figura 1: *Campylobacter jejuni* da campioni ambientali e contenuto intestinale a diversi intervalli di accrescimento dei broilers

Figure 1: Identification of *Campylobacter jejuni* in environmental samples and gut contents from broilers at different growth step



*Campioni prelevati da: pavimento all'ingresso del capannone, pareti, finestre e ventilatori

PRESENZA DI *Campylobacter* spp. NELLE FASI DI MANIPOLAZIONE DELLA CARNE DI POLLAME E IMPLICAZIONI PER LA SALUTE PUBBLICA

Norman J. Stern

Research Leader, Poultry Microbiological Safety Research Unit USDA-Agricultural Research Service
Athens, Georgia 30607-5677 nstern@ars.usda.gov

Parole chiave: *Campylobacter jejuni*, macellazione del pollame, salute pubblica, epidemiologia

Tracking *Campylobacter* spp. in Poultry Operations and Humans

Key words: *Campylobacter jejuni*, poultry operations, public health, epidemiology

Studi epidemiologici nel pollame negli Stati Uniti

L'enterite causata da *Campylobacter* spp. continua a rappresentare un problema di sanità pubblica in tutto il mondo. Solo negli USA si stima che si verifichino, annualmente, più di 2,4 milioni di casi, l'80% dei quali è di origine alimentare. Tale microrganismo che è strettamente associato al commercio del pollame, è considerato il più frequente agente di gastroenterite negli Stati Uniti. Dal momento che i broiler sono frequenti portatori di *Campylobacter jejuni/coli* e che tali microrganismi sono frequentemente dei contaminanti delle carcasse, si pensa che la carne di pollo sia un importante veicolo di trasmissione del *Campylobacter*. L'esposizione del consumatore al *Campylobacter* sembra inevitabile se la carne non viene manipolata in modo igienico e/o cotta adeguatamente prima del consumo. Pertanto vi è un notevole interesse nel ridurre l'infezione da *Campylobacter* nel pollame e diminuire di conseguenza il grado di contaminazione delle carcasse prodotte.

Per controllare l'infezione da *Campylobacter* nel pollo è necessario chiarirne i meccanismi patogenetici. Per questo motivo abbiamo condotto uno studio su 32 gruppi appartenenti a 8 differenti unità delle 4 principali ditte produttrici americane. Queste unità sono state controllate per un intero anno solare. Nel complesso, (87,6%) dei gruppi si sono positivizzati per *Campylobacter*, e solo 4 sono rimasti positivi nell'arco del ciclo di produzione di 6-8 settimane.

Nella maggior parte dei gruppi, campionati ad intervalli bisettimanali, non sono stati identificati campioni di intestino positivi per *Campylobacter* fino all'età di 4-8 settimane. Tuttavia abbiamo trovato che solo sei gruppi erano positivi ai campioni ambientali prima che si positivizzassero anche gli uccelli ed iniziassero ad eliminare *Campylobacter* con le feci. Al contrario alcuni gruppi negativi provenivano da capannoni il cui ambiente era risultato contaminato prima del ciclo produttivo. Questi dati vanno discussi alla luce delle pratiche manageriali adottate negli USA e lasciano qualche dubbio sulla reale origine dell'infezione da *Campylobacter* nei gruppi di pollame. Gli animali sono spesso trasportati al macello in stie (gabbie) che sono già contaminate con *Campylobacter* ed i microrganismi sono talora isolati anche in campioni di acque di scottatura e raffreddamento. Dopo la fase di "chilling" (raffreddamento), la percentuale di carcasse positive per *Campylobacter* variava, a seconda del produttore, da 21,0 a 40,9%, peraltro inferiore a quanto riscontrato in altri studi, tanto che sono possibili diverse spiegazioni.

Trasmissione nei Riproduttori e nei Broiler

In un altro studio, i *Campylobacter*, isolati da gruppi di riproduttori pesanti commerciali e dalla relativa progenie, sono stati caratterizzati e messi a confronto mediante ribotipizzazione e sequenziazione del DNA della regione corta variabile (SVR) del gene della flagellina A. I pattern del "ribotipo" erano identici per gli isolati di *Campylobacter* provenienti dai gruppi parentali e dalla relativa progenie. Inoltre, l'analisi della sequenza del DNA ha fornito la chiara evidenza che i *Campylobacter* isolati da fonti correlate avevano un'origine clonale.

Questo lavoro fornisce la prima prova della trasmissibilità del *Campylobacter* da una generazione alla successiva (trasmissione verticale).

Campylobacter jejuni, un batterio gram-negativo, microaerofilo si ritiene essere oggi il principale agente causale di gastroenterite acuta nella popolazione umana. La manipolazione ed il consumo di pollame o di prodotti correlati al pollame sono considerate essere la principale sorgente di malattie da *Campylobacter* nell'uomo. Il *Campylobacter* ha un rapporto apparentemente "commensale" con il pollame. La patogenesi dell'infezione nel pollo continua ad essere non chiara. Diverse vie sospette di trasmissione orizzontale e potenziali vettori sono stati oggetto di studio; tra questi l'ambiente dei ricoveri, le camere di schiusa, la lettiera, l'alimento, l'acqua di bevanda, il personale, i piccoli animali da cortile, gli insetti ed i roditori. Nonostante ciò il fatto che il *Campylobacter* si trasmetta dal gruppo dei riproduttori alla progenie ha sollevato un considerevole dibattito. La trasmissione tramite uovo è stata inizialmente scartata come ipotesi di origine d'infezione a causa dell'impossibilità di isolare *Campylobacter* da campioni prelevati in incubatoio o da pulcini appena schiusi. Più di recente, tuttavia, diversi lavori pubblicati suggeriscono che è ragionevole pensare che la trasmissione da una generazione all'altra sia possibile. Sebbene vi siano quindi diversi lavori che suggeriscono che la trasmissione trans-ovarica si possa verificare, alcune mancanze nella metodologia di studio hanno reso questo fenomeno difficile da provare. Noi abbiamo utilizzato l'analisi del ribotipo (ribotipizzazione) insieme alla analisi della sequenza del *flaA* SVR DNA per fornire la prova indiziaria che suggerisce che il *Campylobacter* può essere trasmesso dai gruppi di riproduttori parentali ai gruppi di progenie dei broiler. I *Campylobacter* isolati da tre galline riproduttrici e dalla rispettiva progenie sono stati analizzati. Gli isolati di *Campylobacter* ottenuti in Arkansas sono stati raccolti da deiezioni fecali fresche sia dal gruppo di riproduttori o dalla rispettiva progenie

(un gruppo di broiler di 6 settimane allevato a circa 20 miglia dal gruppo parentale).

L'analisi mediante ribotipizzazione è stata eseguita al fine di ottenere uno screening preliminare dei ceppi isolati. L'analisi con l'enzima di restrizione PstI ha permesso di classificare tutti gli isolati dell'Arkansas come appartenenti tutti ad un unico ribotipo. Al fine di sostanziare ulteriormente questo dato, è stata determinata la sequenza della regione corta variabile (SVR) del *flaA* DNA. Le sequenze così ottenute sono state analizzate e si è costruito un dendrogramma. Gli isolati di *Campylobacter* dell'Arkansas mostravano tutti la medesima sequenza. In conclusione, quindi, entrambi i tests utilizzati (ribotipizzazione con PstI e analisi della sequenza SVR *flaA* DNA) hanno dimostrato che i ceppi dell'Arkansas non erano solo epidemiologicamente ma anche geneticamente correlati e molto probabilmente di origine clonale.

Gli isolati di *Campylobacter* considerati nello studio in Georgia derivavano da feci fresche di ovaiole pesanti, stabulate all'interno della stessa azienda di riproduttori, e da carcasse della loro progenie. Il ribotipo con PstI dei ceppi isolati tra riproduttori era identico, così come lo era per quelli isolati tra i broiler. Inoltre il ribotipo era il medesimo nei riproduttori e nei broiler. Analogamente anche le sequenze del SVR *flaA* DNA per i ceppi dei riproduttori e della progenie erano le uguali.

Una possibile spiegazione per le differenze nei ribotipi e nelle sequenze del SVR *flaA* DNA è che un certo numero di cloni di un *Campylobacter* siano presenti all'interno di una unità di broiler e che questi particolari isolati possano rappresentare un clone separato. Cloni distinti possono originare da sorgenti verticalmente, orizzontalmente o da una combinazione delle due modalità.

Una seconda spiegazione possibile è che gli isolati da broiler della Georgia fossero isolati da lavaggi delle carcasse e quindi potessero essere di origine ambientale ed aver contaminato le carcasse durante il processo di lavorazione.

Fino ad oggi sono stati pubblicati pochi dati concernenti le modalità di infezione e di diffusione del *Campylobacter* nei gruppi di pollame. Inoltre, molto di quanto riportato nei lavori è inesatto e quindi fuorviante. In generale, si ritiene che la colonizzazione di *Campylobacter* in un gruppo di broiler origini primariamente da un insieme di sorgenti animali: (a) da altri animali che non siano broiler presenti in azienda; (b) materiali di origine animale esterni all'azienda; (c) animali domestici e insetti.

Per una serie di ragioni (inadeguati metodi di coltura per l'isolamento dai campioni del *Campylobacter* o inadeguatezza della consistenza del campionamento probabilmente quale conseguenza di bassissima frequenza di trasmissione) i primi lavori prodotti affermarono che la trasmissione verticale dalla ovaiole ai pulcini era improbabile.

Di conseguenza, le attuali strategie di intervento sono incentrate principalmente sul controllo del

Campylobacter in azienda o al macello. I nostri risultati hanno fornito la prova concreta che i ceppi di *Campylobacter*, epidemiologicamente correlati, isolati da riproduttori e progenie erano di origine clonale e ciò suggerisce che il *Campylobacter* è in grado di passare da una generazione alla successiva nei broiler. Di conseguenza le strategie di intervento dovranno essere indirizzate verso elementi esclusi in precedenza (gruppi di riproduttori, camere di schiusa e ambienti dell'incubatoio). Il dato epidemiologico è essenziale per gettare le basi di migliori e più corrette strategie di intervento al fine di produrre prodotti alimentari di origine aviare più sicuri.

Studi Islandesi

In un altro studio, tuttora in corso, stiamo determinando il ruolo di *Campylobacter* di origine aviare nella trasmissione all'uomo, all'interno della popolazione islandese. Stiamo realizzando questo studio in Islanda in quanto vi è la possibilità, unica al mondo, di controllare ceppi di origine umana in un'isola che produce tutto il pollame necessario al proprio fabbisogno. Dopo aver eseguito dei sopralluoghi nelle aziende di produzione e trasformazione, abbiamo verificato che vi era una sostanziale sovrapposizione con le tecniche manageriali applicate nell'industria americana. Il consumo di carne di pollo pro-capite in Islanda corrisponde a circa un quarto di quello americano, ma la frequenza di campilobacteriosi (casi /100000 persone) è diverse volte superiore a quanto osservato negli USA. Questo dato induce a considerare se effettivamente la carne di pollo va considerata la principale fonte di infezione di *Campylobacter* per l'uomo.

Fino ad ora abbiamo provveduto a confrontare i *Campylobacter* isolati da lavaggi di carcasse di pollo con i successivi isolati umani. Tutti gli isolati umani sono stati raccolti presso il Iceland's National University Hospital mentre gli isolati ottenuti da lavaggi di carcasse derivavano da una linea di macellazione; entrambi i gruppi di ceppi sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante sequenziamento genetico.

In un gruppo limitato di isolati ottenuti in Agosto e Settembre 1999, abbiamo rilevato una sequenza genetica identica (dei ceppi umani e aviari) della regione corta variabile del genoma della flagellina A del *Campylobacter*. Abbiamo campionato un gran numero di carcasse già macellate e completamente processate in Islanda. La raccolta di questi dati fornirà la determinazione del grado di rischio di infezione umana a seguito di trasmissione di patogeni di origine aviare. In questo studio, infine, sarà calcolata la percentuale di infezioni umane causate da alimenti di origine aviare. Speriamo di poter quindi definire, in successivi studi, quali interventi pratici possono essere realizzati nel settore avicolo e verificare se la loro applicazione influisce in qualche modo sulla comparsa di infezioni nell'uomo.

Tabella 1: Campioni ambientali trovati positivi per *Campylobacter* prima della comparsa dell'infezione in allevamento

Table 1: *Environmental samples found to be Campylobacter-positive prior to the appearance of flock infection*

*Codice del gruppo	Settimane prima che l'infezione fosse identificata	Campioni positivi (%) nella settimana (e) precedenti l'infezione
AHF	4	Tamponi "strisciati" (100)
ALS	4	**Topi (100), insetti (25,0)
ALF	0	Feci di uccelli selvatici (50,0)
DLW	4	Feci animali domestici (100)
DLS	2	Feci animali domestici (100)
DLSu	4	Tamponi "strisciati" (100)

*La lettera iniziale corrisponde ad un codice del produttore A-D; la seconda lettera indica un gruppo ad elevata (H) o bassa (L) performance; la lettera finale corrisponde alla stagione: inverno (W), primavera (S), estate (Su) e autunno (F). NA, non applicabile; ND, nessun dato; NF, non trovato. ** animali catturati all'esterno.

Tabella 2: Campioni ambientali trovati positivi per *Campylobacter* in gruppi rimasti poi *Campylobacter*-free

Table 2: *Environmental samples found to be Campylobacter-positive for flocks that remained free from Campylobacter*

*Codice del gruppo	Campioni positivi (%) durante il periodo d'ingrasso
BHW	Tamponi strisciato (66,6), tamponi ventilatori (50,0)
CHW	**Intestini di topi (50,0), feci uccelli selvatici (50,0), acqua d'abbeveratoio (100)
CLW	Feci uccelli selvatici (50,0)

*La lettera iniziale corrisponde ad un codice del produttore A-D; la seconda lettera indica un gruppo ad elevata (H) o bassa (L) performance; la lettera finale corrisponde alla stagione: inverno (W), primavera (S), estate (Su) e autunno (F). NA, non applicabile; ND, nessun dato; NF, non trovato. ** animali catturati all'esterno.

COCCIDIOSI NEL BROILER: INDAGINE AL MACELLO

T. Trentin¹, S. Ferrarini², M.A. Bozza³, F. Mutinelli³¹Istituto delle vitamine S.p.A. - Milano ²ASL n. 6 - Vicenza ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (PD)Parole chiave: coccidiosi, *Eimeria*, broiler, macello avicolo, visita ispettiva**Coccidiosis in broiler: survey at slaughterhouse**Key words: coccidiosis, *Eimeria*, broiler, poultry slaughterhouse, meat inspection

Summary: A survey on coccidiosis of broilers was performed at a poultry slaughterhouse from October 1999 to February 2000 in order to evaluate its frequency and the possible influence on broiler carcass quality. Pre-slaughter and *post mortem* findings were confirmed by means of the direct microscopic examination of the intestinal content and histopathology of the intestine wall. A total of 727.439 female, 35-40 day-old broilers from two yellow skinned commercial hybrids were examined. Thirty-two groups of broilers (53%) out of 58 examined resulted positive for coccidial enteritis, and in these groups carcass quality appeared to be reduced. Therefore, the effects of coccidiosis on poultry health should be considered also for the downgrading it may have on poultry carcass quality, and specific prophylactic measures should be implemented.

Correspondence: F. Mutinelli - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - via Romea 14/A, 35020 Legnaro (PD) - e-mail: fmutinelli.izsv@interbusiness.it

Introduzione

La coccidiosi è una parassitosi sostenuta da protozoi del genere *Eimeria*, largamente diffusa nelle specie avicole ed in particolare nel broiler. Essa determina generalmente un'enterite che nella forma clinica oltre ai sintomi provoca anche mortalità, mentre in quella subclinica riduce l'incremento ponderale giornaliero e conseguentemente l'indice di conversione (2,3). Non di rado la coccidiosi interferisce con la pigmentazione della cute e dei tarsi.

Scopo del presente lavoro è stato valutare la presenza di *Eimeria* spp. nei diversi tratti dell'intestino di broiler al macello e la possibile correlazione fra lesioni intestinali e caratteristiche quali-quantitative delle carcasse.

Materiali e metodi

Le osservazioni eseguite al macello durante la visita pre-macellazione e *post mortem* sono state successivamente confermate con l'esame microscopico a fresco, eseguito su materiale prelevato dalla mucosa intestinale, e con l'esame istologico (1).

I gruppi di broiler considerati nell'indagine sono accomunati dalle seguenti caratteristiche: femmine a pigmentazione cutanea gialla appartenenti a due diversi ibridi commerciali, età compresa fra 35 e 40 giorni di vita e con peso medio vivo oscillante fra 1.650 e 1.800 g. L'indagine iniziata ad ottobre 1999 si è conclusa a febbraio 2000. I gruppi di broiler alla visita pre-macellazione sono stati identificati e definiti omogenei per provenienza, età, sesso, peso corporeo, capannone, tipologia e linea genetica. Per ogni gruppo di volatili è stata esaminata la documentazione sanitaria (All. IV, DPR 495/97) e la dichiarazione di scorta sull'uso del farmaco (art. 15, D. Lgs. 4 agosto 1999 n. 336). Pezzetti di intestino con lesioni riferibili a coccidiosi sono stati prelevati in sede di ispezione *post mortem* e fissati in formalina tamponata al 10%. Gli stessi sono stati processati per l'istologia secondo la tecnica di routine e colorati con ematossilina-eosina.

Risultati

Durante la visita pre-macellazione oltre all'identificazione dei volatili si è proceduto al loro controllo clinico, con particolare riferimento allo stato fisico delle feci (colore e consistenza) ed all'eventuale imbrattamento delle penne. Per alcuni gruppi di broiler è stato possibile rilevare durante la visita pre-

macellazione la presenza di diarrea emorragica o feci mucose di colore arancione sul terreno circostante le gabbie o adese alle pareti delle gabbie stesse utilizzate per il ritiro dei volatili vivi.

Ogni gruppo di broiler è stato inoltre accuratamente controllato durante la visita *post mortem*. Sono stati esaminati 58 gruppi di broiler femmina per un totale di 727.439 volatili. In 32 gruppi, pari al 53% di quelli controllati, erano presenti, seppure in percentuali diverse, lesioni macroscopicamente riferibili ad enterite da coccidi. In sei gruppi di volatili su 32 con lesioni riferibili a coccidiosi (18,7%) è stato possibile osservare contemporaneamente la presenza di tifiite emorragica (*E. tenella*) e duodenite catarrale (*E. acervulina*). Nel caso di tifiite emorragica in fase acuta, anche in percentuale elevata (70-80% dei volatili in esame), non sono stati evidenziati durante la visita ispettiva *post mortem* peggioramenti significativi dello stato sanitario o comunque riflessi sulla non conformità delle carcasse. Lesioni sempre ciecali, ma in fase ormai cronica, hanno comportato invece una maggiore eterogeneità nel gruppo sia per quanto riguarda la conformazione della carcassa sia per la pigmentazione della cute e dei tarsi. Nei tre gruppi di volatili in cui non è stato possibile classificare in modo certo il tipo e la natura dell'enterite che ha interessato circa il 20% dei soggetti, lo scarto sanitario è risultato decisamente superiore.

Reperto ispettivo ed istopatologico. Nel caso di lesioni ciecali riferibili ad *E. tenella* si è osservata la presenza di copiose emorragie (Figura 1) con aumento localizzato del volume intestinale. Nelle fasi più avanzate della patologia si è osservata invece una riduzione del volume dei ciechi, accompagnata da un ispessimento delle pareti ed una colorazione biancastra di questa porzione dell'intestino. In questi casi nel lume si è riscontrata frequentemente la presenza di materiale necrotico frammisto a sangue coagulato.

E. acervulina ha determinato lesioni duodenali caratterizzate dalla formazione di strie biancastre osservabili prima ancora dell'apertura dell'intestino. Nelle fasi più avanzate della patologia enterica è stato possibile il riscontro di un ispessimento delle pareti e la presenza di petecchie sulla mucosa.

Quando l'infezione era riferibile ad *E. maxima*, il tratto medio dell'intestino appariva aumentato di volume, con le pareti ispessite e nel lume era presente materiale schiumoso o essudato mucoso di colore arancione. Talvolta erano evidenti petecchie emorragiche sulla mucosa intestinale. Istologicamente in corso di coccidiosi la mucosa intestinale appare ispessita per la presenza nel citoplasma delle cellule epiteliali di coccidi nelle diverse fasi evolutive (Figura 2). La mucosa è interessata da lesioni infiammatorie che nei casi più gravi sono di tipo necrotico-emorragico.

Conclusioni

Nei casi osservati alla visita ispettiva *post mortem* la tiflite emorragica sostenuta da *E. tenella* ha determinato la presenza di una maggiore eterogeneità nei gruppi di broiler sia per quanto riguarda la pezzatura sia per la pigmentazione. Nel caso di *E. maxima* sono risultate più evidenti le alterazioni delle caratteristiche organolettiche ed in particolare la

presenza di soggetti con carni scure. Dall'indagine emerge la conferma che la coccidiosi rappresenta costantemente una minaccia per le produzioni del settore avicolo, sia per i danni diretti (mortalità), ma soprattutto per quelli indiretti rappresentati dal minor indice di conversione e dal ridotto incremento ponderale, nonché per i riflessi sulle caratteristiche merceologiche ed organolettiche delle carcasse.

Bibliografia

- 1) Goodwin M.A., Brown J., Bounous D.I. (1998) "Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect *Eimeria maxima* in chickens". Avian Pathol 27, 405-408.
- 2) McDougal L.R. (1997) "Coccidiosis" In: Calnek B.W., Barnes H.J., Berard C.W., McDougal L.R., Saif Y.M. (Eds.) Diseases of Poultry. 10th edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 865-883.
- 3) Yogaratnam V. (1995) "Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant". Vet Rec 137, 215-217.

Tabella 1: Distribuzione delle lesioni riferibili a coccidiosi nei 32 gruppi di broiler colpiti.

Table 1: Localisation of the lesions in the 32 coccidiosis-affected groups of broiler

	N. gruppi positivi	% di positività	N. capi esaminati	frequenza media %
Tiflite emorragica (<i>E. tenella</i>)	19	59	245.127	34,8
Duodenite (<i>E. acervulina</i>)	9	28	130.128	18,2
Enterite del tratto medio (<i>E. maxima</i>)	6	18	76.988	22,8
Enterite aspecifica del tratto medio	3	9	37.920	20,3

COMUNICAZIONE 2

INFEZIONE CONCOMITANTE DA VIRUS DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (Pbfd) E POLIOMAVIRUS AVIARE IN PARROCCHETTI DAL COLLARE INDIANI (*Psittacula krameri manillensis*)

G. Conzo¹, A. Lavazza², D. Nieddu², D. Fulgione³, M. Milone³, A. Fioretti¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviaria, Università di Napoli "Federico II". ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia. ³Dipartimento di Zoologia, Università di Napoli "Federico II"

Parole chiave: poliomavirus, Pbfd, diagnosi, parrocchetto dal collare

A concurrent psittacine beak and feather disease (Pbfd) virus and avian polyomavirus infection in ring-necked parakeets (*Psittacula krameri manillensis*)

Key words: polyomavirus, Pbfd, diagnosis, ring-necked parakeet

Summary: A concurrent outbreak of Pbfd and Polyomavirus infection in a Ring-necked parakeets (colour mutations) facility is reported. Typical feathers' lesions, suggestive of Pbfd, involved 4 months old parakeets with high mortality reported in the following months. Necropsy revealed typical Polyomavirus lesions. An attempt to diagnose Pbfd by PCR from blood and liver of an infected parakeet was successful. Electron microscopy was useful to detect Polyomavirus particles from liver, spleen and ovary of two dead birds. Because no other psittacine species of the same facility were involved, a well parakeet-adapted Pbfd virus strain in this outbreak is hypothesized. Polyomavirus positive ovary seems confirm the possibility of the trans-ovarian transmission of this disease.

Correspondence: Gino Conzo, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviaria, Università di Napoli "Federico II", via F. Delpino 1, 80137 Napoli. E-mail: ginoconzo@tin.it

Introduzione

Il virus della Malattia del Becco e delle Penne degli Psittacidi (Pbfd) determina, nella sua forma subacuto-cronica, gravi lesioni distrofiche delle penne ed immunodepressione in varie specie di Pappagalli, in particolare di origine australiana, africana ed asiatica, di età inferiore ai 3 anni. Le alterazioni del

becco, non sempre presenti, occorrono successivamente. Il Polioma virus aviario è in grado di determinare una malattia ad evoluzione iperacuta o acuta in giovani Psittacidi di qualsiasi specie e d'età inferiore ai 150 giorni, caratterizzata da morte improvvisa, talora preceduta da stasi del gozzo, rigurgito ed emorragie cutanee. Singolarmente la

malattia interessa quasi esclusivamente soggetti allevati artificialmente, mentre è praticamente assente nei piccoli allevati dai genitori. I due virus sono, al momento, i più temuti patogeni per gli allevamenti amatoriali di Pappagalli. Descriviamo un episodio di malattia sostenuta da entrambi i virus in un allevamento di Parrocchetti dal collare.

Materiali e metodi

Pappagalli. L'allevamento ospita circa cento coppie di Parrocchetti di numerose mutazioni di colore, oltre ad altre specie di Psittacidi (Cacatua, Inseparabili, Parrocchetti australiani). Nel 1996 l'allevatore nota, senza darvi grande importanza, la comparsa di piume distrofiche in alcuni novelli di 4 mesi d'età. Poiché nei due anni successivi i casi aumentano in modo esponenziale, si sospetta che l'epidemia sia dovuta alla BPDF, diagnosi confermata attraverso la tecnica della PCR eseguita in Inghilterra (presso la *University Diagnostic Ltd, Teddington, UK*) su campioni ematici provenienti dai soggetti con le tipiche lesioni. Dopo ogni stagione riproduttiva ben pochi sono stati i soggetti con piume distrofiche in grado di superare l'inverno successivo per cui, nel 1999, l'allevatore decide (anche nell'intento di eradicare la malattia) di sopprimere tutti i novelli presentanti i segni di PBF. 5 soggetti vengono, tuttavia, risparmiati ed ospitati, in assoluto isolamento, presso il Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò.

Diagnosi di laboratorio. Con l'intento di confermare, mediante PCR, la diagnosi di PBF nei Parrocchetti in nostro possesso viene prelevato un campione di sangue da un soggetto con eclatanti lesioni distrofiche delle penne. Dallo stesso soggetto, venuto a morte alcune settimane dopo, viene prelevato anche un frammento di fegato per la medesima ricerca. Il controllo negativo è rappresentato da un campione ematico di Parrocchetto dal collare selvatico ed in buona salute. L'estrazione del DNA è stata effettuata con la classica procedura fenolo/cloroformio/alcool isoamilico (25:24:1); gli acidi nucleici sono stati successivamente purificati mediante etanolo e poi ripresi in 100 µl di TE *buffer* (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0). Sono stati preparati due coppie di *primers* per l'amplificazione (1):

A' – TGGTACAAGGAGGACTGTGAC

A'' – CCAGCACTTAATAAACACTCAG

B' – GTCTTTATTAAGTGCTGGGA

B'' – GTCACAGTCTGTTGTACC

La prima coppia produce un frammento di 368 bp e la seconda un frammento relativo alla rimanente porzione del genoma circolare del virus, circa 1664 bp. Il protocollo di PCR ha previsto l'utilizzo di un programma di amplificazione strutturato in 35 cicli: 95°C per 1 min (denaturazione), 58°C per 1 min (ibridazione), 72°C per 2 min (estensione). I tre prodotti di amplificazione sono stati elettroforizzati in gel di agarosio 1,5% in presenza di un marcatore molecolare per la determinazione della lunghezza dei frammenti.

Nel giro di 4 mesi i 5 Parrocchetti sono venuti a morte e l'esame autoptico ha evidenziato lesioni molto simili a quelle prodotte dal Poliomyavirus (emorragie cutanee, epatosplenomegalia, pallore di muscoli, miocardio e rene). Campioni di cervello, cute, fegato, milza ed ovaio prelevati da 2 soggetti sono stati sottoposti alla ricerca di particelle virali attraverso la microscopia elettronica (ME). I campioni sono stati

sminuzzati ed omogenizzati in presenza di PBS (pH 7,4) in rapporto 1/5 (p/v). La sospensione è stata sottoposta a due cicli di congelamento, scongelamento rapidi, quindi a centrifugazione a 4000 g per 20' ed a 9300 g per 10'. 85 µl del secondo supernatante sono stati processati secondo la metodica di colorazione negativa previa ultracentrifugazione con "Airfuge Beckman", in uso presso il laboratorio di M.E. dell' I.Z.S. di Brescia (3). Le griglie ottenute sono state colorate negativamente con NaPT al 2% (pH 6,8) ed osservate con un TEM Philips CM10.

Risultati

PCR: dal gel è stato possibile osservare la presenza di un prodotto di amplificazione esclusivamente nei campioni di sangue e fegato, ritenuti quindi positivi al virus della PBF.

M.E.: L'esame ultramicroscopico ha permesso di osservare numerose particelle virali, nei campioni epatici, splenici ed ovarici, morfologicamente riferibili a Poliomyavirus. Dal fegato di un solo soggetto (lo stesso testato anche con la PCR) è stato possibile osservare anche particelle virali Circo-like ed Entero-like, queste ultime rinvenute anche nella milza del secondo Pappagallo esaminato.

Discussione

Nel caso illustrato l'effetto immunosoppressivo del virus della PBF (6) ha, con ogni probabilità, aperto la strada all'azione patogena del *Poliomyavirus* che, come detto, non viene generalmente evidenziata in piccoli allevati dai genitori. Molto probabilmente, quindi, il *Poliomyavirus* presente nell'allevamento non si sarebbe mai manifestato in assenza del virus della PBF, anche perché l'allevatore non usa allevare artificialmente i neonati. L'azione combinata dei due virus, già descritta in precedenza soprattutto in Inseparabili ed Ondulati (2,5), spiega l'evoluzione particolarmente grave della malattia e l'elevata mortalità osservata. Pappagalli affetti da PBF in forma cronica possono, infatti, sopravvivere, completamente deplumati, anche per alcuni anni (6). E' singolare notare come nessun'altra specie di Psittacidi sia stata coinvolta in questo focolaio, sebbene tutti gli altri Pappagalli ospitati in allevamento (ed a stretto contatto con i Parrocchetti) siano considerati altamente sensibili ad entrambe le malattie. Ciò farebbe supporre che questo focolaio sia dovuto ad un virus particolarmente adattato alle mutazioni di colore del Parrocchetto dal collare; i soggetti mutati di varie specie di Psittacidi risultano, infatti, maggiormente sensibili a varie infezioni (ed hanno una durata media della vita inferiore) rispetto ai loro simili ancestrali. L'agente virale che causa la PBF contiene un genoma composto da un *single strand* DNA di circa 2kb (1,7). L'amplificazione mediante PCR di materiale genetico, estratto da animali infetti, con primers specifici del DNA virale rappresenta un efficace strumento diagnostico della malattia (4), come dimostrato anche da questi nostri risultati preliminari. A differenza del campione ematico, quello epatico ha presentato soltanto la frazione leggera amplificata con A'A''. Questo potrebbe essere imputabile a variabili proprie della procedura di amplificazione per cui risulta sempre consigliabile utilizzare entrambe le coppie di *primers* per una valutazione più accreditabile. La M.E. ha permesso di confermare il sospetto del coinvolgimento del

Poliomavirus in questo focolaio; la presenza di questo virus nell'ovaio, inoltre, confermerebbe l'ipotesi della trasmissione verticale della malattia. Il ruolo del virus *Enterolike* (e la sua eventuale azione patogena) in questo caso non è ben chiaro.

Bibliografia

- 1) Bassami M.R., Berryman D., Wilcox G.E., Raidal S.R. (1998). Psittacine Beak and Feather Disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine Circovirus, plant Circovirus and Chicken Anemia virus. *Virology*, 249, 453-459.
- 2) Latimer K.S., Niagro F.D., Campagnoli R., Ritchie B.W., Pesti D.A., Steffens W.L. (1993) Diagnosis of concurrent Avian Polyomavirus and Psittacine Beak and Feather Disease infections using DNA probes. *Journal of Association of Avian Veterinarians*, 7, 141-146.
- 3) Lavazza A., Pascucci S., Gelmetti D. (1990) Rod shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet. Rec.*, 125, 581.
- 4) Niagro F.D., Ritchie B.W., Latimer K.S. (1990) Use of polimerase chain reaction for detection of PBFD and BFD in suspect birds. *Proc. Annual Conf. Ass. Avian Vet. Phoenix, Arizona, Sept. 10-15, 1990.* 25-37.
- 5) Ramis A, Latimer K.S., Gibert X., Campagnoli R. (1997). A concurrent outbreak of Avian Polyomavirus and Psittacine Beak and Feather Disease infection in a Budgerigar collection. *Proceedings of the 4th Conference of the European Committee of the Association of Avian Veterinarians.* London, England, May 19th-24th, 1997. Pp. 132-135.
- 6) Ritchie B.W. & Carter K. (1995) *Avian viruses: function and control.* Wingers Publ.
- 7) Ritchie B.W., Niagro F.D., Lukert P.D., Steffens W.L., Latimer K.S. (1989). Characterization of a new virus from Cockatoos with Psittacine Beak and Feather Disease. *Virology*, 171, 83-88.

COMUNICAZIONE 3

DIAGNOSI DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI MEDIANTE LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Bert¹ E., Appino² S., Cerruti Sola¹ S.

¹*Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia*

²*Dipartimento di Patologia animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino*

Parole chiave: malattia del becco e delle penne (PBFD), pappagalli, PCR

Diagnosis of psittacine beak and feather disease using polymerase chain reaction (PCR) assay

Key Words: psittacine beak and feather disease, psittacine birds, PCR

Summary: In order to detect PBFD viruses in psittacine birds we designed a PCR assay based on ORF1 PBFD virus genome. Heparinised blood or samples of feather were collected from 36 psittacine birds both with feather lesions and without. DNA was extracted using *Wizard Genomic DNA purification*® kit (Promega, USA) and PCR amplification was carried out using the method described by Ypelaar (1999). The 8.3% of birds tested were found positive to PBFD PCR assay, both using blood sample and dystrophic feathers. All of these birds showed clinical signs, as variable degree of dystrophy and feather loss; only one bird had severe beak lesions. On the basis of our results we can confirm that the PCR assay represent a reliable tool for the diagnosis of PBFD in psittacine birds.

Correspondence: Bert E.- Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia, Sezione di Malattie infettive- Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci n°44, 10095 Grugliasco (Torino) – E-mail: elenabert@yahoo.com

Introduzione

La malattia del becco e delle penne degli psittacidi (*Psittacine Beak and Feather Disease*) è stata descritta per la prima volta nella metà degli anni settanta nei pappagalli del Sud del Pacifico (5). La patologia ha un andamento cronico ed è caratterizzata da distrofia e perdita delle penne, accrescimento anormale del becco con fratture e necrosi del palato. L'esito della malattia è quasi sempre infausto (8). L'eziologia virale della PBFD è stata dimostrata tramite la trasmissione naturale e sperimentale della patologia (3). Nei preparati istologici delle penne e dell'epitelio dei follicoli delle penne si osservano corpi inclusi intracitoplasmatici e intranucleari basofili che al microscopio elettronico si presentano come strutture paracrystalline costituite da particelle virali (3,8). Il virus appartiene alla famiglia Circoviridae, ha un diametro che va dai 14 ai 17 nm, icosaedrico, senza envelope. Il DNA virale è di 1,7 – 2,0 kb, a catena singola e circolare (1,9). La diagnosi della PBFD non può essere eseguita basandosi sui segni clinici, poiché numerosi altri agenti eziologici possono determinare lesioni simili. Indagini istopatologiche possono essere effettuate per individuare la presenza

di corpi inclusi prodotti da PBFD nell'epitelio dei follicoli delle penne, ottenuto da biopsia. Benchè il reperto di corpi inclusi sia considerato diagnostico, alcuni autori hanno verificato che corpi inclusi simili a quelli causati da PBFD si rinvengono anche in caso di infezioni da adenovirus e polyomavirus (7). Altre tecniche diagnostiche sono state sperimentate da diversi autori, quali indagini in microscopia elettronica a trasmissione, metodiche di immunoistochimica, di ibridazione *in situ*, e ancora tecniche sierologiche quali l'emoagglutinazione e l'inibizione dell'emoagglutinazione (2,6,8). Secondo Ritchie (1995), il metodo che offre maggior sensibilità e specificità per la diagnosi della PBFD è rappresentato dalla ricerca del DNA virale tramite sonde o la PCR (polymerase chain reaction).

Il test di PCR è stato sperimentato sia in USA (4) che in Australia (9). L'obiettivo di questo lavoro è mettere a punto, nel nostro laboratorio, un test di PCR che permetta di individuare gli animali colpiti da PBFD.

Materiali e metodi

Uccelli. Sono stati prelevati campioni da 36 pappagalli di differenti specie (*Agapornis personata*, *Amazona aestiva*, *Amazona farinosa*, *Amazona ochrocephala*,

Cacatua alba, *Cacatua oftalmica*, *Myiopsitta monachus*, *Poicephalus senegalus*, *Psittacula krameri*, *Psittacus erithacus*) provenienti sia da allevamenti che da privati.

Campioni. Ad ogni soggetto è stato prelevato il sangue dalla vena giugulare e conservato in litio eparina per max 3 giorni a 4° gradi, prima di estrarre il DNA. Ai soggetti sintomatici sono state asportate penne distrofiche, conservate anche queste a 4° in provetta sterile, al fine di estrarre il DNA. Su altre penne raccolte verranno eseguite in un secondo tempo esami istopatologici e di microscopia elettronica. Estrazione del DNA virale e amplificazione. Si è eseguita l'estrazione del DNA virale sia dal sangue intero che dalle penne. Per l'estrazione è stato usato il Wizard genomic DNA purification kit® (Promega). La metodica di amplificazione si è basata su quella sperimentata da Ypelaar (1999) con opportune modificazioni. Viene amplificata una porzione della regione conservata nell'open reading frame (ORF1) del PBFDV. Sono stati utilizzati i primers indicati da Ypelaar come n°2 e n°4; il prodotto di amplificazione è di 717 basi. L'amplificazione avveniva con la temperatura di denaturazione di 94° per 1 min, di 55° per l'annealing per 1 min, e di 72° per l'estensione per 1.5 min, per 35 cicli, usando il Thermal Cycler Cetus Perkin Elmer.

Risultati

Sul totale di 36 animali, 29 non presentavano sintomi, 3 soggetti (2 *Cacatua oftalmica* e 1 *Psittacus erithacus*) presentavano sintomatologia suggestiva di PBFV con distrofia e perdita delle penne delle remiganti e della coda. Un soggetto presentava anche lesioni gravi al becco con frattura trasversale e necrosi del palato. Altri 4 psittacidi (*Amazona aestiva*, *Cacatua alba*, *Agapornis personata*, *Myiopsitta monachus*) avevano sintomi clinici riferibili anche ad altre patologie.

L'8,2% degli animali è risultato positivo alla PBFV, con la PCR; si trattava dei tre soggetti che manifestavano sintomi clinici riferibili alla malattia in esame. E' stato possibile evidenziare la presenza del PBFV virus sia da campioni di sangue intero che da campioni di penne raccolte sui soggetti sintomatici.

Discussione

Il test PCR si è confermato un metodo pratico e preciso per la diagnosi di PBFV. Un aspetto interessante è rappresentato dal fatto che il materiale

diagnostico può essere costituito dalla polpa delle penne, il che permette di evitare agli uccelli lo stress del prelievo di sangue. Il limite dei dati per ora ottenuti sta nel fatto che solo i soggetti clinicamente ammalati sono risultati positivi al test, il che ci permette di ipotizzare che gli animali apparentemente sani non siano comunque infetti. Questa situazione non ci ha permesso quindi di ricavare dati relativi alla possibilità di individuare mediante la PCR infezioni molto precoci in animali asintomatici o soggetti portatori, secondo quanto peraltro già affermato da altri ricercatori (8).

Bibliografia

1. Latimer KS, Rakich W, Steffens WL, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD (1991) "A Novel DNA virus associated with feather inclusions in psittacine beak and feather disease." *Vet Pathol* 28:300-304
2. Latimer KS, Niagro FD, Rakich W, Campagnoli RP, Ritchie BW, Steffens WL, Pesti D, Lukert PD (1992) "Comparison of DNA Dot-blot hybridization, immunoperoxidase staining and routine histopathology in the diagnosis of psittacine beak and feather disease in paraffin-embedded cutaneous tissues." *J. Assoc Avian Vet* 6 (3):165-168
3. McOrist S, Black DG, Pass DA, Scott PC, Marshall J (1984) "Beak and feather dystrophy in wild sulfur-crested cockatoos (*Cacatua galerita*)." *J. Wild Dis* 20: 120-124
4. Niagro FD, Ritchie BW, Latimer SK (1990) "Polymerase chain reaction detection PBFV virus and BFD virus in suspect birds." *Proc. Annu Conf Avian Vet* : 25-37
5. Perry RA (1983) "Some feather characteristics of acute French moult in fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*)." *Aust Vet Pract* 13:128
6. Raidal SS, Sabine M, Cross GM (1993) "Laboratory diagnosis of psittacine beak and feather disease by haemagglutination and haemagglutination inhibition." *Aust Vet J* 70:133-137
7. Ramis A, Latimer KS, Niagro FD, Campagnoli RP, Ritchie BW, Pesti D (1994) "Diagnosis of psittacine beak and feather disease (PBFV) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psittacine tissues using DNA *in situ* hybridization." *Avian Path* 23:643-657
8. Ritchie BW, Carter K (1995) "Psittacine beak and feather disease" in "Avian viruses: function and control." Wingers publishing inc, Florida, USA, 223-251
9. Todd D, Niagro FD, Ritchie BW (1991) "Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA." *Archiv Virol* 117:129-135
10. Ypelaar I, Bassami MR, Wilcox GE, Raidal SR (1999) "A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus." *Vet Micro*, 68:141-148.

OSSERVAZIONI SULLE CELLULE SECERNENTI BOMBESINA NEGLI STOMACI DI POLLI DI LINEA LEGGERA E PESANTE *

V. Grieco¹, T. Rampin¹, P. Persico¹, C. Domeneghini²

¹Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi, Milano

²Istituto di Anatomia degli Animali Domestici con Istologia ed Embriologia, Università degli Studi, Milano

Parole chiave: pollo, bombesina, proventricolo, ventriglio, immunohistochimica.

Observations on bombesin secreting cells in gizzard and proventriculus of broilers and layer pullets

Key words: chicken, bombesin, proventriculus, gizzard, immunohistochemistry

Summary: Bombesin is an hormone participating in food intake regulation. Immunohistochemistry for proventricular and ventricular bombesin secreting cells was performed in broilers and layer pullets. No difference was observed in morphology and distribution of bombesin cells in the two chicken types examined. However the bombesin cells number was always higher in layer pullets than in broilers. The significance of these results is discussed.

Correspondence: Rampin T. Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Facoltà di Medicina Veterinaria – Via Celoria 10 – 20131 Milano.

Introduzione

Nel tratto alimentare vengono rilasciati circa una dozzina di peptidi che hanno effetti diretti sulla funzionalità dell'apparato digerente e/o azione a livello del Sistema Nervoso Centrale, tra cui la bombesina (BBS); questi peptidi sono stati studiati con tecniche di immunohistochimica nei diversi tratti del digerente del pollo (9). La BBS stimola il rilascio di gastrina, agendo anche sulla secrezione pancreatica e la motilità intestinale (5). Inoltre insieme alla colecistochinina la BBS viene considerata come uno dei fattori che regolano a livello centrale il senso di sazietà nei mammiferi (4). Anche negli uccelli entrambi i peptidi causano una soppressione dell'assunzione di alimento, che risulta essere dose dipendente (10).

L'azione della BBS a livello centrale è stata confermata anche nel corso di prove sperimentali con somministrazione per via intracerebroventricolare in tacchini (2) ed è stato visto che si verificava un'alterazione del comportamento alimentare che portava i soggetti ad una diminuzione dell'assunzione di cibo. Sempre in tacchini adulti risulta che la BBS provoca diminuzione dell'assunzione di alimento ed acqua agendo sia a livello periferico (apparato digerente) che a livello di Sistema Nervoso Centrale (3).

Nella bibliografia concernente la BBS che fa riferimento alla specie pollo non viene mai riportata la linea genetica degli animali utilizzati nella sperimentazione, nonostante le grandi differenze comportamentali tra polli di linea leggera e pesante proprio riguardo l'assunzione di alimento (1, 7, 8). Infatti, la produzione di BBS, in quanto fattore di regolazione del senso di sazietà, potrebbe variare tra polli di linea pesante e polli di linea leggera. Scopo del presente lavoro è proprio verificare se esistano differenze per quanto riguarda numero, aspetto e distribuzione delle cellule produttrici BBS tra le due diverse linee produttive e se queste differenze siano tali da spiegare la diversità di comportamento alimentare.

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 12 pulcini di sesso maschile di due linee, una leggera e una pesante, schiusi in incubatoi commerciali e alloggiati in isolatori Montair fino alla fine delle osservazioni. Acqua di bevanda e mangime

erano forniti *ad libitum*. L'alimento era costituito da un mangime del commercio primo periodo broiler, per i soggetti di linea pesante, ed un mangime del commercio primo periodo pollastra, per i soggetti di linea leggera. A 2, 5, 12, 19, 26 e 33 giorni di vita sono stati sacrificati un soggetto leggero (L) ed un soggetto di linea pesante (P) rispettivamente. Tutti gli abbattimenti sono sempre stati eseguiti alla stessa ora del giorno e gli animali avevano modo di alimentarsi fino al sacrificio. Ogni soggetto veniva pesato e sacrificato mediante dislocazione delle vertebre cervicali e sottoposto a necropsia, durante la quale si prelevava una sezione longitudinale di stomaco muscolare e di stomaco ghiandolare. Gli organi prelevati venivano fissati in formalina tamponata al 10% a temperatura di refrigerazione per un periodo di 24 ore ed inclusi in paraffina. Per ciascun campione venivano tagliate sezioni longitudinali a tutta lunghezza della mucosa del proventricolo e del ventricolo di 4 micron di spessore sia per la colorazione con Ematossilina-Eosina (EE) sia per l'esame immunohistochimico.

L'esame immunohistochimico è stato effettuato applicando la metodica avidina-biotina-perossidasi (ABC) (6). Quale siero primario è stato impiegato un anticorpo policlonale (Peninsula UK, IHC 7113 Rabbit anti-bombesin serum-Lot.n.° 029875-2) prodotto in coniglio e specificatamente diretto contro la bombesina di anfibio (*Hyla bombina*). L'anticorpo è stato usato alla diluizione di 1:28.000. Sulla base di un primo esame delle sezioni, si è proceduto alla conta delle cellule bombesina-positive di tutti i campioni a 250 ingrandimenti. La valutazione dei campioni è stata fatta alla cieca ed in ordine casuale. Nella conta sono stati considerati, per ogni campione, 6 campi per il proventricolo (3 campi di ghiandole superficiali e 3 campi di ghiandole profonde) e 3 campi per il ventriglio, dove le ghiandole sono collocate solo superficialmente.

Risultati

Nel corso del periodo di osservazione nei due gruppi non sono stati osservati sintomi clinici e gli animali abbattuti non hanno mai presentato alterazioni viscerali macroscopicamente rilevabili. Nell'ingluvie e negli stomaci degli animali sacrificati era sempre presente materiale alimentare. L'andamento dei pesi

dei soggetti delle due linee è riportata in figura 1. L'esame istologico delle sezioni colorate con EE del proventricolo e del ventriglio di tutti i soggetti considerati non ha evidenziato alterazioni. L'esame immunostochimico è risultato positivo per ciascuno dei 12 campioni esaminati. La positività era rappresentata da una colorazione brunastra a carico del citoplasma delle cellule contenenti bombesina. La morfologia delle cellule BBS positive pareva variare con l'età. Infatti, nei primi 2 prelievi (2 e 5 giorni di vita), queste erano di volume ridotto e con poco citoplasma, mentre nei soggetti di età maggiore apparivano ovali, lievemente più grandi delle cellule epiteliali e con citoplasma stipato di secreto positivo. Nel proventricolo le cellule positive erano riconoscibili sia all'apice che alla base dei rilievi della mucosa frammiste alle cellule epiteliali, in maniera sparsa e discontinua. Nelle ghiandole profonde le cellule BBS positive erano evidenziabili presso la cavità centrale, frammiste alle cellule epiteliali secernenti. Nel ventriglio le cellule BBS positive erano poste, in maniera sparsa, sia alla base che all'apice dei rilievi della mucosa. In entrambi gli stomaci, le cellule BBS positive erano del tipo "chiuso", orientate cioè con l'asse maggiore perpendicolare o leggermente obliquo rispetto a quello delle cellule epiteliali che invece è decisamente orientato verso il lume. L'immunoistochimica, ha evidenziato anche la presenza di sottili prolungamenti cellulari, ripieni di granuli immunomarcati, e rivolti verso le cellule epiteliali, segno di attività di tipo paracrino delle cellule BBS produttrici. In figura 2 sono riportati i risultati delle conte delle cellule BBS positive. Come si può notare, tutti i soggetti di linea leggera avevano un numero di cellule BBS positive sempre più elevato rispetto ai soggetti di linea pesante. Ciò è stato riscontrato non solo riguardo al numero complessivo rilevato nei due stomaci, ma anche per i totali parziali di proventricolo e ventriglio e, a livello di proventricolo, per i due tipi di ghiandole considerati (superficiali e profonde).

Discussione

Dalle presenti osservazioni è possibile seguire l'evoluzione delle cellule BBS positive nelle prime 3 settimane di vita: si assiste ad un progressivo aumento del loro numero in entrambi gli stomaci e dal secondo prelievo (5 giorni di vita) si modifica anche la loro morfologia, la loro forma diventa decisamente rotondeggiante od ovale e il citoplasma più abbondante e più ricco di granuli immunomarcati. Questi cambiamenti quantitativi e qualitativi sono verosimilmente in rapporto con l'assunzione di alimento e l'attività funzionale dell'apparato digerente. Dal confronto delle 2 linee produttive diverse non sono emerse differenze per quanto riguarda morfologia e distribuzione anatomica delle cellule BBS, invece dal punto di vista quantitativo le conte permettono di rilevare una differenza costantemente presente in entrambi gli stomaci tra leggeri e pesanti. L'entità di questa differenza a favore dei leggeri è minima subito dopo la schiusa (2 giorni di vita) e si amplia decisamente nei successivi prelievi. Quindi l'aumento

delle cellule BBS positive riscontrato nelle prime settimane di vita è molto più marcato nei soggetti della linea leggera, pur verificandosi anche in quelli pesanti. Alla differenza nel numero delle cellule BBS fa verosimilmente riscontro una differenza nella produzione gastrica di BBS tra polli leggeri e polli da carne. Non è possibile dare un significato preciso a questa differenza o metterla in un sicuro rapporto causale con le differenze di comportamento alimentare tra i 2 tipi produttivi. Indubbiamente l'entità stessa del divario tra le cellule BBS positive dei polli leggeri e pesanti è verosimile che non sia casuale ma risponda a specifiche esigenze fisiologiche delle 2 specializzazioni produttive. Queste ultime possono condizionare non solo la produzione di BBS ma anche degli altri peptidi dotati di funzione di regolazione sia sul tratto gastroenterico sia sul sistema nervoso centrale. I risultati aprono nuove prospettive di indagine su tale argomento e consigliano di tener conto della specializzazione produttiva della linea genetica utilizzata negli studi che riguardano aspetti morfofunzionali dell'apparato digerente della specie pollo. L'ipotesi che la maggior produzione di BBS nei polli di linea leggera possa contribuire a spiegare il moderato comportamento alimentare che questi mostrano in confronto ai pesanti potrebbe essere suffragata da analoghe osservazioni a carico della colecistochinina, che con la BBS viene considerata un fattore regolatore dell'appetito a livello centrale.

Bibliografia

- 1) Barbato G.F., Cherry J.A., Siegel P.B., Van Krey H.P. (1980) "Quantitative analysis of the feeding behavior of four populations of chickens" *Physiol. Behav.* 25, 885-891.
- 2) Denbow D.M. (1985) "Food intake control in birds" *Neurosci Bioheav. Rev.*, Summer; 9, 223-232
- 3) Denbow D.M. (1989) "Centrally and peripherally administered bombesin decreases food intake in turkeys" *Peptides* Mar-Apr. 10, 275-279.
- 4) Gibbs J., Smith G.P. (1986) "Satiety: the roles of peptides from the stomach and the intestine" *Fed. Proc.* Apr; 45, 1391-1395.
- 5) Hill K.J. (1983) "Physiology of the digestive tract" in: Freeman B.M.: *Physiology and biochemistry of the domestic fowl.* vol. 4, Academic Press, London, 33-35.
- 6) Hsu S., Raine L., Fanger H. (1981) "Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: a Comparison between ABC and Unlabeled (PAP) Procedures" *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29, 577-580
- 7) Masick B., Wood-Gush D.G.M., Duncan I.J., Mc Corquadale C., Savory C.J. (1974) "A comparison of the feeding behavior of young broiler and layer males" *Brit. Poultry Sci.* 15, 499-505
- 8) Nir I., Nitran Z., Dror Y., Shapira N. (1978) "Influence of overfeeding on growth, obesity and intestinal tract in young chickens" *Brit. J. Nutr.* 39, 27-35
- 9) Rawdon B.B. (1984) "Gastrointestinal hormones in birds: morphological, chemical and developmental aspects" *J. of Exp. Zool.* 232, 659-670
- 10) Savory C.J. (1999) "Temporal control of feeding behaviour and its association with gastrointestinal function" *J. Exp. Zool.* 283, 339-347.

Figura 1: Pesi dei soggetti
Figure 1: Weight of the chickens

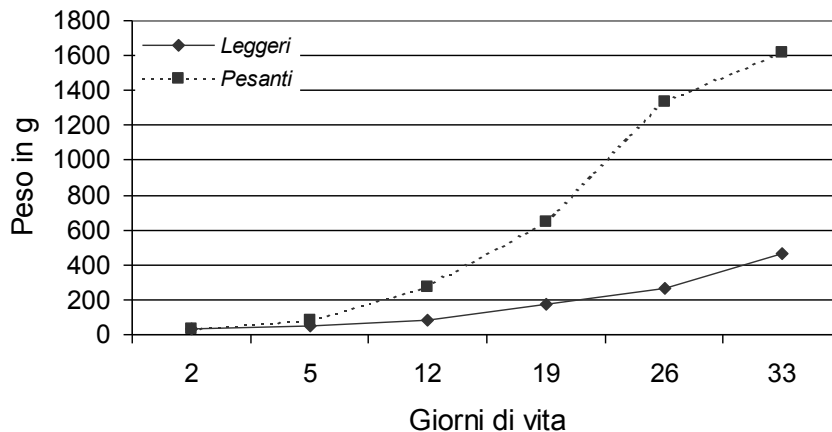
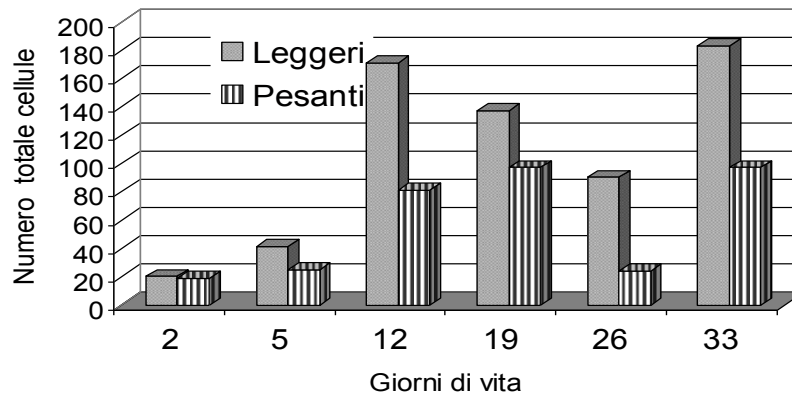


Figura 2: Risultati delle conte delle cellule bombesina positive
Figure 2: Results of bombesin cells counting



COMUNICAZIONE 5

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *CAMPYLOBACTER* spp. IN ALLEVAMENTI AVICOLI DEL NORD ITALIA

A. Borrelli¹, S. Cerruti Sola¹

¹Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino

Parole chiave: broiler, faraona, galletto livornese, *Campylobacter* sp., isolamento

Survey on the incidence of *Campylobacter* spp. infections in flocks in Northern Italy

Key Words: broiler, guinea fowl, cockerel, *Campylobacter* sp., isolation

Summary: 1131 cloacal swabs obtained from poultry (broilers, Guinea fowl, cockerels) bred in Northern Italy were tested for the presence of *Campylobacter* spp.. *Campylobacter* was never isolated from birds younger than 3 weeks, whereas in older birds the percentage of recovery was 80% in broilers, 53% in Guinea fowl and 76% in cockerels. 89% of the isolates belonged to the species *jejuni*.

Correspondence: Cerruti Sola S., Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Via Nizza 52, 10126 Torino, Italia

Introduzione

Campylobacter spp. è un microrganismo presente in una grande varietà di specie animali ed è un patogeno emergente nelle infezioni gastroenteriche dell'uomo. Indagini compiute in diversi paesi hanno dimostrato che le infezioni da *Campylobacter* sono comuni nel pollo al momento della macellazione. In Italia la presenza di *Campylobacter jejuni* è stata segnalata

nell'apparato riproduttore di galline ovaiole in deposizione.(2)

Scopo di questo lavoro è stato verificare la presenza di infezioni da *Campylobacter* spp. nei volatili allevati nel Nord-Italia e stabilirne la specie di appartenenza.

Materiali e metodi

Campionamento. Tutti gli uccelli, oggetto della nostra indagine, provenivano da allevamenti del Nord Italia di

tipo industriale, rappresentativi di diverse tipologie tecnologiche uniformemente distribuiti sul territorio e sono stati esaminati nell'arco di un anno solare. Sono stati eseguiti prelievi cloacali da 511 broilers in 6 allevamenti, nella proporzione di un campione per ogni 1000 animali presenti. Tra questi animali 463 avevano meno di tre settimane di vita, mentre i restanti 48 avevano compiuto la quarta settimana di vita.

Altri 620 tamponi sono stati effettuati al momento della macellazione su soggetti appesi alla catena (520 broilers provenienti da 6 allevamenti, 50 galletti livornesi provenienti da 4 allevamenti e 30 faraone provenienti da 3 allevamenti). Complessivamente sono stati esaminati 1131 campioni.

Esami batteriologici. Per i prelievi eseguiti in allevamento sono stati utilizzati tamponi per batteriologia dotati di apposito terreno di trasporto (Amies); i campioni venivano nel più breve tempo possibile (massimo 4 ore) condotti in laboratorio e inoculati in tubi per batteriologia contenenti brodo selettivo di arricchimento (Oxoid Limited, England).

I tamponi prelevati al macello venivano invece inoculati direttamente in tubi da batteriologia contenenti il brodo selettivo di arricchimento, condotti in laboratorio e messi ad incubare a 42-43°C per 24 ore nelle giare, in condizioni di microaerofilia. Quindi veniva eseguita la semina su piastra (Oxoid Limited, England), e dopo ulteriori 24 ore le colonie Gram - con bacilli di aspetto spirillare e/o ricurvo, ossidasi e catalasi positive sono state congelate a -80°C per essere sottoposte a successive prove di identificazione.

Al fine di verificare quali siano le migliori condizioni per la sopravvivenza e la crescita dei batteri, 50 soggetti sono stati esaminati eseguendo tamponi cloacali in doppio. In un caso il materiale veniva direttamente posto nei tubi da batteriologia contenenti il brodo di arricchimento selettivo, mentre nell'altro i tamponi venivano immessi nel terreno di trasporto (Amies) fino al raggiungimento del laboratorio, e quindi inoculati nel brodo di arricchimento.

Identificazione di specie. L'identificazione delle colonie cresciute su Agar Sangue è stata eseguita con il sistema API CAMPY (BioMerieux Italia S.p.A.)

Risultati

Tutti i soggetti di età inferiore alle tre settimane sono risultati negativi per la presenza di *Campylobacter* spp., mentre 29 uccelli di età superiore alle 4 settimane (precisamente 40 giorni) e provenienti da 2 allevamenti sono risultati positivi.

Al momento della macellazione sono risultati positivi a livello cloacale 416 soggetti su 520 (80%). I prelievi condotti in doppio su 50 soggetti hanno permesso di riscontrare che il successo nell'isolamento è decisamente maggiore quando i tamponi vengono inoculati direttamente nei tubi contenenti terreno di arricchimento. Infatti in questo caso *Campylobacter* è stato isolato da 36 uccelli su 50, mentre nel caso dell'utilizzo del terreno di trasporto è stato possibile coltivare il batterio soltanto in 21 casi.

Tra i galletti livornesi sono risultati positivi 38 soggetti (76%), provenienti da 3 allevamenti, mentre nelle faraone si è isolato il batterio da 16 soggetti su 30 (53%), provenienti da 3 allevamenti.

Non sono state notate differenze stagionali nell'isolamento di *Campylobacter* spp.

Per quanto riguarda l'identificazione di specie, l'89% dei campioni esaminati risultava essere positivo per *Campylobacter jejuni*, il 9% per *Campylobacter coli* ed il 2% per *Campylobacter lari*.

Discussione

La percentuale di positività riscontrata al momento della macellazione risulta notevolmente elevata e sembrerebbe persino superiore a quella descritta in altri paesi industrializzati (5).

I dati qui riportati sembrano comunque confermare le osservazioni compiute da altri ricercatori, sulla base delle quali i broilers rappresenterebbero un importante serbatoio dell'infezione (6) e *C. jejuni* sarebbe la specie predominante nei volatili (6).

E' interessante osservare che non solo i broilers, ma anche altre specie di volatili, sembrano essere colpite di frequente dall'infezione.

Sempre in accordo con quanto descritto da altri autori (1), la presenza di *Campylobacter* sembra aumentare molto con il progredire della vita degli animali, risultando nulla nei soggetti molto giovani, per poi manifestarsi dopo le 4 settimane ed ulteriormente aumentare alla fine del ciclo vitale degli uccelli. Questa situazione potrebbe enfatizzare l'importanza del rispetto delle misure di biosicurezza negli allevamenti, al fine di limitare i fattori di rischio (4), ma appare anche in contrasto con la dimostrazione che la via verticale rappresenterebbe una modalità di trasmissione importante (2).

Dal punto di vista tecnico, bisogna notare come l'inoculazione diretta dei tamponi nel terreno di arricchimento abbia permesso un maggiore successo nell'isolamento e considerare che i dati ottenuti in allevamento, quando ancora non era stata fatta questa osservazione, potrebbero effettivamente stabilire una situazione di frequenza minore di quella reale.

Bibliografia

- 1) Berrang, M. E., Cox, N.A., Musgrove, M.T., Stern, N.J. (1998). "Recovery of *Campylobacter* from dry poultry associated samples." *Poultry Science*. 77:96.
- 2) Cox, N.A., Stern, N.J., Hiatt, K.L., Berrang, M.E. (1999). "Campylobacter passage from hen to offspring through the egg." 34° National Meeting on Poultry Health e Processing. Ocean City, Maryland. October 20-22, 1999. 6-7.
- 3) Di Modugno, G., Nasti, R., Camarda, A. (1998). "Ricerche sulla presenza di *Campylobacter jejuni* nell'apparato riproduttore di ovaiole in deposizione." *Selezione Veterinaria*. No. 8-9, 637-643.
- 4) Hald, B., Olsen, A., Madsen, M. (1998). "Typhaea stercorea (Coleoptera: Mycetophagidae), a carrier of *Salmonella enterica* serovar Infantis in a Danish broiler house." *Journal of Economic Entomology*. 91: 660-664.
- 5) Humphrey, T.J. (1994). "Epidemiological investigations into the colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*." Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of *Campylobacteriosis* 25-27 April 1994 (pp 153-158) Geneva: World Health Organisation.
- 6) Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M. (1997). "Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine." *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 19: 47-56.

CRITERI OPERATIVI E VERIFICHE MICROBIOLOGICHE NELL'APPLICAZIONE DEL METODO HACCP IN CENTRI DI IMBALLAGGIO UOVA IN CAMPANIA

A. Cerrone, F. Mariani, A. Piccirillo, M. Maiello, L.F. Menna, M. Calabria, A. Fioretti
 Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviare, Università di Napoli Federico II

Parole chiave: HACCP, gravità, misure di controllo, verifica, *Salmonella* spp.

**HACCP in egg processing, application of the method in packing centers in Campania region (Italy).
 Organization and management program and microbial evaluations**

Key Words: HACCP, severity, control measure, verification, *Salmonella* spp.

Summary: The AA report the quantitative and qualitative microbiological data and the sampling procedures regarding the application of the HACCP methods in five egg packing centers in Campania region (Italy) in order to establish the organisation and management of HACCP program in this peculiar food processing sector.

Correspondence: Anna Cerrone, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviare, Università di Napoli Federico II, via F. Delpino 1, 80137, Napoli. E-mail: annacerr@tin.it

Introduzione

Il recente recepimento a livello nazionale della Direttiva 93/43/CEE (D.Lgs. n. 155/97) impone alle aziende del settore alimentare l'esigenza di doversi assumere direttamente la completa responsabilità della qualità igienica dei prodotti immessi sul mercato al fine di garantire, attraverso una scrupolosa opera di pianificazione e prevenzione, la sicurezza degli alimenti (3). Tale concezione si discosta notevolmente da quella tradizionale che attribuiva un ruolo primario, nel garantire la sicurezza dei prodotti destinati all'alimentazione, al cosiddetto "controllo ufficiale" secondo quanto previsto dalla Direttiva 89/937/CEE. L'attività di vigilanza finora si svolgeva attraverso sopralluoghi ispettivi e controlli analitici, effettuati su prodotti finiti già posti in commercio, che permettevano per lo più di mettere in luce i risultati di un procedimento di produzione non idoneo (2). L'applicazione del metodo HACCP determina indirettamente un miglioramento ed una razionalizzazione dei processi produttivi e delle procedure all'interno dell'azienda, attraverso l'elaborazione del Manuale di Autocontrollo Aziendale. Quest'ultimo è un documento prescrittivo, specifico in quanto si riferisce al sistema processo-prodotto di una data azienda e deve essere pertanto "personalizzato" e finalizzato alla dimostrazione dell'adozione di un sistema di autocontrollo sulle attività critiche che

costituiscono il processo produttivo. L'aspetto innovativo della normativa è quello di prefigurare un sistema di gestione organico, sistematico e continuo delle problematiche legate alla sicurezza alimentare. Il produttore nel sistema dei controlli non risulta più semplice destinatario di vincoli ed obblighi, ma assume un ruolo attivo e responsabile nell'adozione di misure idonee a garantire la sicurezza alimentare. L'applicazione del metodo HACCP in cinque Centri di imballaggio di uova destinate al consumo umano è l'oggetto del presente lavoro, con il quale si intende illustrare i criteri operativi seguiti e gli esiti delle verifiche analitiche ottenuti nel periodo compreso tra giugno 1999 e giugno 2000.

Materiali e metodi

Il sistema di autocontrollo può e deve essere introdotto nelle aziende in maniera graduale ed evolutiva, sono stati quindi individuati dapprima pochi punti molto critici da tenere sotto controllo, successivamente il controllo è stato esteso ad un maggior numero di punti sempre meno critici. I controlli microbiologici, relativi ai 24 sopralluoghi effettuati nelle 5 aziende, sono stati eseguiti con cadenza bimestrale nella sala di imballaggio, nel deposito, nei locali spogliatoio/bagno e negli automezzi destinati al trasporto delle uova (Tabella 1) mediante l'impiego di *sponge bag*, piastre esposte e su campioni di uova (Tabella 2)

Tabella 1: Siti di prelevamento e numero dei campioni per l'esecuzione delle verifiche microbiologiche effettuate
Table 1: Sites of sampling and number of samples taken for the microbiological analyses carried out

Sala di imballaggio (<i>Sponge bag</i> totali: 384; Piastre esposte totali: 288)						
Tratto anteriore selezionatrice (24)	Sito Pesata (96)	Tratto posteriore selezionatrice (24)	Polvere (48)	Pavimento (96)	Pareti (96)	Uova (864): ✓selezionatrice ✓rotte e sporche
Locale deposito (<i>Sponge bag</i> totali: 300; Piastre esposte totali: 360)						
Spogliatoio e/o bagno (<i>Sponge bag</i> totali: 225)						
Polvere (135)		Pavimento (195)			Pareti (195)	
Automezzi per il trasporto delle uova (<i>Sponge bag</i> totali: 105)						
Battistrada (35)		Abitacolo destinato ad accogliere i grossi imballaggi (70)				

Tabella 2: Microrganismi ricercati e protocolli per l'isolamento ed identificazione
Table 2: Type of agents searched and procedures for isolation and identification

Germe Patogeno Ricercato	Procedura di identificazione			
	Pre - Arricchimento	Arricchimento	Agar Selettivo	Identificazione biochimica
E. coli	BPW (37°C per 24h)		APHA (37°C per 24h)	Sistema API20E (bioMerieux)
Salmonella spp	BPW (37°C per 24h)	RVSB (42°C per 24h)	BGA (37°C per 24h)	Sistema API20E (bioMerieux)
Streptococchi β - emolitici	BPW (37°C per 24h)	BHI (37°C per 24h)	SSM (37°C per 24 h con 5% di CO ₂)	Sistema API20STREP (bioMerieux)
Stafilococchi coagulasi +	BPW (37°C per 24h)	BHI (37°C per 24h)	BPA (37°C per 48h)	Sistema API Staph (bioMerieux)
Pseudomonas spp	BPW (37°C per 24h)	BHI (37°C per 24h)	PAB (37°C per 24h)	Sistema API 20NE (bioMerieux)
Lieviti e muffe			SDA (25°C e 37°C per 5-30 gg)	

Legenda Terreni di coltura (Oxoid): APHA (MacConkey Agar n°3); BGA (Brilliant Green Agar Modified); BHI (Brain Heart Infusion Broth); BPA (Baird – Parker Agar Base); BPW (Buffered Peptone Water); PAB (Pseudomonas Agar Base); RVSB (Rappaport – Vassiliadis Soya Broth); SDA (Sabouraud Dextrose Agar); SSM (Streptococcus Selective Medium); TSI (Triple Sugar Iron Agar);

Risultati

Sono state individuate le fasi che possono rivelarsi critiche per la sicurezza igienico-sanitaria dell'alimento, avvalendosi dei principi su cui si basa il metodo HACCP. I risultati ottenuti evidenziano un notevole polimicrobismo ambientale, con particolare incidenza della presenza di lieviti e muffe (100% delle Aziende controllate) il cui rinvenimento è stato ottenuto anche dalla superficie e dal contenuto delle uova. Inoltre, si è avuta positività per la ricerca della Salmonella spp in due dei Centri sottoposti a controllo (40%) ove il germe è stato isolato, in un caso, dalla polvere della sala imballaggio e dalla selezionatrice, mentre nell'altro dal pavimento del locale deposito. Infine la carica mesofila totale ambientale ha evidenziato uno stato igienico-sanitario degli impianti non ottimale in 2 casi (40%).

Discussione

Con la Circolare 7 agosto 1998 n. 11 (Applicazione del D. Lgs. 26 maggio 1997 n. 155) relativamente alla produzione di uova viene precisato che il Decreto in oggetto non si applica alle operazioni precedenti a quelle effettuate presso il centro di imballaggio, sia esso annesso o meno all'azienda produttrice. Tale condizione diviene premessa essenziale per una obiettiva valutazione dei risultati. Infatti se da un lato si deve convenire che il processo produttivo relativo all'alimento "uova" nei Centri di imballaggio è estremamente semplice, concretizzandosi nelle sole operazioni di raccolta e confezionamento, dall'altro, diversamente da molte altre sostanze alimentari (latte e derivati, prodotti carnei lavorati ecc.) la comunicazione diretta attraverso l'anaconda con il sito di produzione primaria (capannoni per l'allevamento animale) diviene sovente la regola. Tali situazioni, pertanto, sortiscono un duplice effetto: una drastica riduzione della tipologia dei pericoli (difficilmente un agente fisico potrà essere rilevato nel prodotto confezionato) a fronte di un notevole incremento del rischio che patogeni d'allevamento contaminino le uova. I risultati ottenuti evidenziano un notevole polimicrobismo ambientale, con particolare incidenza della presenza di lieviti e muffe; inoltre desta moderata preoccupazione il dato che sul totale di 24 prelievi effettuati nei cinque Centri si è avuta positività per la ricerca della Salmonella spp. In un simile contesto,

quindi, diviene quanto mai importante, per ciascun rischio la valutazione della gravità (*severity*) per ottenere dalla combinazione dei due fattori (rischio x gravità) un Indice di Pericolosità (I.P.), utile per definire una gerarchizzazione dell'attività di prevenzione (*control measure*). Analogamente solo un'accurata attività di monitoraggio (*Monitor*) può verificare, per esempio, il rispetto da parte del personale di disposizioni previste in apposite procedure. Questo va inteso come insieme di osservazioni che si effettuano mentre il processo è in atto e che danno informazioni sul suo andamento in tempo utile per l'attuazione di interventi correttivi, prevenendo così difetti nel prodotto. Al monitoraggio devono essere affiancati interventi di verifica (*Verification*), che informano sull'andamento del processo con ritardo rispetto allo stesso e che non consentono pertanto un intervento correttivo immediato, mentre costituiscono un utile strumento per valutare l'efficacia del piano HACCP (3). Uno degli aspetti a tutt'oggi discutibili è la validità delle modalità di applicazione del Sistema HACCP inteso nella sua globalizzazione in quanto è indispensabile la necessità dell'attiva partecipazione del gestore dell'azienda affinché tale processo acquisisca un reale significato. Ciò trova conferma nel fatto che, a prescindere dall'esito delle verifiche periodiche condotte in regime di autocontrollo e dall'obbligatorietà legislativa dell'applicazione del Piano, la qualità igienica dei prodotti alimentari immessi sul mercato può essere garantita solo attraverso una "capillare" organizzazione della gestione aziendale che veda concretamente coinvolte tutte le unità lavorative, dal cui operato e formazione dipende il raggiungimento dei validi obiettivi che il Metodo HACCP si prefigge di raggiungere. Per gli operatori del settore alimentare l'applicazione dell' HACCP potrebbe sembrare un aggravio dei costi di gestione della propria attività. In realtà gli oneri derivanti dall'attuazione del decreto non devono essere considerati come costi aggiuntivi, bensì come investimenti sulla salute dei consumatori, sulla garanzia della qualità totale del prodotto e sul miglioramento dell'attività dell'azienda.

Bibliografia

- 1) AA.VV., 1994, Metodi di processo e di controllo degli alimenti, Schede informative n. 1-2/94, Istituto Scotti

- Bassani per la ricerca e l'informazione scientifica e nutrizionale, Milano.
- 2) Perego C., 1999, Il ruolo dei laboratori di analisi e l'apporto del biologo nella implementazione e nella verifica di un sistema di autocontrollo., In: Atti del

- convegno "HACCP: applicazione pratica ed aspetti sanzionatori", Milano, 26 aprile 1999.
- 3) Spooloar D., Tramontin S., Maiello A., 1998, L'H.A.C.C.P. attraverso la sua terminologia, Pulizia Industriale e Sanificazione, suppl. n.3, 12, 1-24.

COMUNICAZIONE 7

SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA AVIARE IN EMILIA ROMAGNA. RISULTATI DEL MONITORAGGIO SIEROLOGICO GENNAIO-MAGGIO 2000

M. Tamba¹, P. Massi², E. Finelli¹, G.Tosi²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - CEREV
²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Sezione di Forlì

Parole chiave: avicoli, Influenza Aviare, monitoraggio, sorveglianza

Surveillance on Avian Influenza in Emilia Romagna Region. Results of a survey carried out from January to May 2000

Keywords: avian Influenza, monitoring, poultry, surveillance

Summary: From January to May 2000 a serological survey on AI virus subtype H7N1 was carried out in the flocks of Emilia-Romagna Region of Italy. 153 out of the 51.997 samples examined by HI resulted positive. One LPAI outbreak in turkeys was detected. Most of the positive sera samples was collected from ducks and geese, pheasants and partridges. A flock of day-old chickens showing transitory seropositivity was recorded. Survey results seem to indicate a limited spread of AI in Emilia-Romagna Region during the HPAI epidemic involving the other Regions of Northern Italy.

Correspondence: Tamba Marco - Centro Emiliano Romagnolo di Epidemiologia Veterinaria - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna - Via Fiorini, 5 - 40127 Bologna. Tel./ Fax +39-051503216 - e.mail: izsle@iperbole.bologna.it

Introduzione

Il virus dell'Influenza Aviare (AI) che infettano il pollame vengono divisi in due distinti gruppi sulla base della loro patogenicità sul pollo: ceppi ad alta patogenicità (HPAI) e ceppi a bassa patogenicità (LPAI). In Italia solamente per i casi dovuti a virus HPAI sono previsti provvedimenti di Polizia Veterinaria (2). Dal 1959 ad oggi, nel mondo si sono verificate 18 epidemie di HPAI e tutte hanno riguardato virus appartenenti ai sottotipi H5 e H7 (1). Questi sottotipi però presentano anche ceppi LPAI e la mutazione di patogenicità da LPAI a HPAI era già stata osservata per il sottotipo H5 negli USA e nel Messico (1). Questo fenomeno invece non era stato registrato per il sottotipo H7 prima di dicembre 1999, quando un ceppo di virus influenzale H7N1 a bassa patogenicità che circolava nella popolazione avicola del Nord Italia dal mese di marzo mutò, diventando HPAI.

In seguito alla mutazione del virus sono state prese diverse misure di polizia sanitaria volte alla eradicazione dell'infezione dal territorio nazionale, tra queste è stato istituito a partire dal mese di gennaio 2000 il controllo clinico e sierologico dei gruppi di riproduttori, delle pollastre prima dello spostamento e dei pulcini di 1 giorno all'arrivo in azienda, quando provenienti dalle province senza focolai (3). Il controllo sierologico aveva principalmente lo scopo di individuare ed evitare il movimento di gruppi di animali infetti da virus LPAI.

Scopo della presente nota è illustrare i risultati dei controlli sierologici svolti dai Servizi Veterinari Ufficiali della Regione Emilia Romagna nel periodo in cui tali misure sono state mantenute (gennaio-maggio 2000).

Materiali e metodi

Da ciascun gruppo di volatili sottoposto a controllo venivano prelevati 20 campioni di sangue, tale campionamento permette di rilevare con il 95% di probabilità una prevalenza di animali sieropositivi

superiore al 14%. I campioni prelevati sono stati esaminati per AI mediante inibizione dell'emoagglutinazione (HI) nei confronti del sierotipo H7. I campioni sono stati esaminati prevalentemente presso la Sezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZSLER) di Forlì; un numero minore di sieri sono stati esaminati presso le Sezione IZSLER di Lugo e Reggio Emilia.

Al momento del prelievo veniva compilata da parte dei Servizi Veterinari A.USL una scheda contenente i dati essenziali sull'anagrafica dell'allevamento e sulla tipologia degli animali sottoposti a controllo sierologico. I dati contenuti nella scheda informativa ed i risultati delle prove di laboratorio sono stati archiviati su supporto informatico ed elaborati presso il CEREV, secondo procedure automatizzate.

Risultati

Sono stati analizzati i dati relativi a 1.782 controlli in allevamento e 1.046 controlli al macello per complessivi 51.997 campioni esaminati, 153 dei quali risultati positivi per virus influenzale sottotipo H7 (0,29%). Nelle Figure 1 e 2 sono riportate rispettivamente le specie e le province di provenienza dei campioni, che rispettano la distribuzione del patrimonio avicolo regionale, la maggior parte dei campioni, infatti proviene da polli (77,8%) e dalla provincia di Forlì (58,3%).

Nelle Tabelle 1 e 2 sono riportati i risultati dei controlli eseguiti rispettivamente al macello e in allevamento. Sono state rilevate 9 casi di sieropositività: 7 in allevamento e 2 al macello. In tutte le aziende con sieropositività sono stati eseguiti esami virologici e solamente in un caso, un'azienda di tacchini risultata positiva al macello (9 campioni positivi su 10 esaminati) è stato possibile dimostrare la presenza di virus LPAI. Le 3 aziende di anatidi (riproduttori oche e anatre) risultate positive appartengono alla medesima proprietà, l'elevato numero di campioni positivi in

questi allevamenti è dovuto al fatto che i gruppi "problema" sono stati testati più volte sia virologicamente che sierologicamente senza che fosse stato possibile evidenziare sierconversione o la presenza di virus influenzale. Un gruppo di broiler, riscontrato sieropositivo all'arrivo in azienda (8 campioni positivi su 20 esaminati), è invece risultato negativo al ricontrollo virologico e sierologico eseguito 10 giorni dopo. Gli altri episodi di sieropositività, infine, sono stati registrati in un gruppo di fagiani, in un gruppo di pernici rosse e in un allevamento rurale correlato per introduzione di animali con il focolaio LPAI nei tacchini.

Discussione

I risultati dell'attività di sorveglianza sierologica attuata in Emilia Romagna mostrano come, a parte un caso sporadico, il virus H7N1 a bassa patogenicità non abbia circolato negli allevamenti avicoli della Regione. Le poche sieropositività rilevate, infatti, hanno riguardato per lo più animali allevati all'aperto (anatre,

ocche, fagiani e pernici rosse) e quindi con diverse possibilità di contatto con volatili selvatici.

Si ritiene che la sostanziale assenza di virus LPAI nella popolazione avicola della Regione sia uno dei motivi, forse il principale, per il quale l'Emilia Romagna è stata solo marginalmente coinvolta nell'epidemia di Influenza Aviaria che ha flagellato le altre Regioni del Nord Italia tra dicembre 1999 e aprile 2000.

Bibliografia

- Alexander D.J. (2000) "A review of avian influenza in different bird species". Vet. Microbiol., 74, 3-13.
- D.P.R. 15.11.1996, n.656 "Regolamento per l'attuazione della Direttiva 92/40/CEE che istituisce misure comunitarie di lotta contro l'Influenza aviaria". G.U.R.I. n. 300 del 23.12.1996.
- Nota Ministero della Sanità 14.01.2000, n. 600.6/24461/57N/139 "Misure urgenti in materia di prevenzione della diffusione dell'influenza Aviaria".

Figura 1: Distribuzione dei campioni esaminati per specie
Figure 1: Examined samples by species

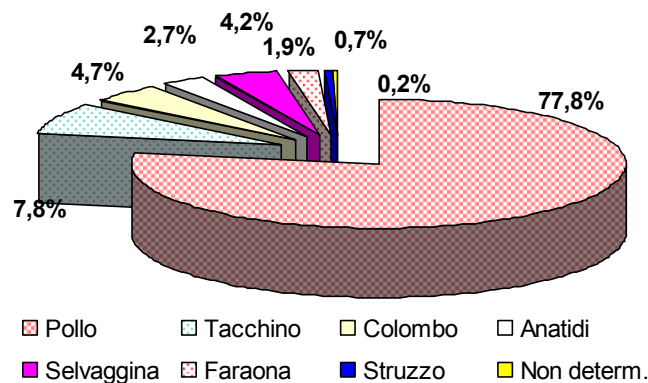


Figura 2: Distribuzione dei campioni esaminati per provincia di provenienza
Figure 2: Examined samples by provinces

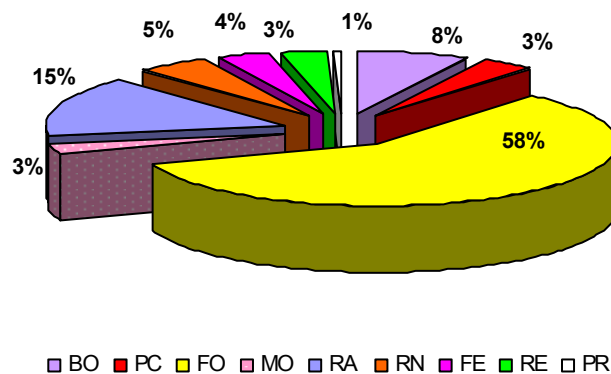


Tabella 1: Riepilogo dei controlli per Influenza Aviaria effettuati al macello su animali dell'Emilia Romagna
Table 1: Results of AI serological controls on birds coming from Emilia-Romagna at slaughterhouse.

Specie animale	Partite esaminate	Partite positive	%	Campioni esaminati	Campioni positivi	%
Pollo	782	1	0,1%	15.188	1	0,0%
Tacchino	40	1	2,5%	668	9	1,3%
Colombo	219	0	0,0%	2.205	0	0,0%
Selvaggina	2	0	0,0%	31	0	0,0%
Faraona	2	0	0,0%	35	0	0,0%
Struzzo	1	0	0,0%	3	0	0,0%
TOTALE	1.046	2	0,2%	18.130	10	0,1%

Tabella 2: Riepilogo dei controlli per Influenza Aviaria effettuati in allevamento in Emilia Romagna.**Table 2:** Results of AI serological controls in flocks of Emilia-Romagna.

Indirizzo produttivo	Allevamenti controllati	Allevam. positivi	%	Numero controlli	Campioni esaminati	Campioni positivi	%
Polli riproduttori	83	0	0,0%	477	9.545	0	0,0%
Pollastre	164	0	0,0%	346	6.757	0	0,0%
Galline ovaiole	34	0	0,0%	43	844	0	0,0%
Altri polli	223	1	0,4%	405	7.747	8	0,1%
Tacchini riprod.	11	0	0,0%	37	716	0	0,0%
Tacchini carne	77	0	0,0%	163	2.884	0	0,0%
Faraone	20	0	0,0%	50	939	0	0,0%
Selvaggina	38	1	2,6%	104	1.909	16	0,8%
Anatidi	11	3	27,3%	68	1.215	112	9,2%
Colombi	10	0	0,0%	11	210	0	0,0%
Struzzi	24	0	0,0%	32	345	0	0,0%
Misti	16	2	12,5%	46	756	7	0,9%
TOTALE	711	7	1,0%	1.782	33.867	143	0,4%

COMUNICAZIONE 8

STUDY OF THE SURVIVAL RATE OF *C. jejuni* ON DIFFERENT FOOD CONTACT SURFACES

A. De Cesare¹, B. Sheldon², L. A. Jaykus³, A. Franchini¹

¹Istituto di Zootecnica, Università di Bologna; ²Dept. Poultry Science, North Carolina State University; ³Dept. Food Science, North Carolina State University

Key Words: cross contamination, *Campylobacter jejuni*, surfaces

Studio della dinamica di sopravvivenza di *C. jejuni* su alcune superfici di lavorazione degli alimenti

Parole chiave: contaminazione crociata, *Campylobacter jejuni*, superfici

Riassunto: Per valutare la dinamica di sopravvivenza di *C.jejuni* su alcune superfici di lavorazione degli alimenti, cinque ceppi rappresentativi sia isolati ambientali che ceppi di referenza sono stati inoculati in campioni di metallo e formica. Prima dell'inoculo i ceppi sono stati sospesi in Tryptycase Soy Broth (TSB) per simulare le condizioni di sopravvivenza delle cellule su una superficie contaminata, ed in Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7) per simulare le condizioni di sopravvivenza delle cellule su una superficie pulita. I risultati ottenuti dimostrano che sia la natura della superficie che le condizioni ambientali influenzano la dinamica di sopravvivenza delle cellule di *C.jejuni*.

Correspondence: A. De Cesare, Istituto di Zootecnica, Facoltà di Agraria, Università di Bologna, alessand@kaiser.alma.unibo.it

Introduction

Although many cases of *Campylobacter* enteritis have been attributed to undercooking of poultry (3), cross contamination of raw to cooked foods has been identified as a significant risk factor for *C. jejuni* infections (1,2). Cross contamination may be particularly important in relation to the high prevalence of contamination in raw poultry products and other foods and the low infectious doses that have been reported for *Campylobacter* species. The objective of this study was to assess the survival rate and persistence of *C. jejuni* under varying organic loads on stainless steel and a Formica™ laminate surface used in food preparation areas.

Materials and methods

The five *C. jejuni* strains used in the study were obtained from the U.S. Department of Agriculture-Agriculture Research Service (Athens, GA) and Qualicon Inc. (Wilmington, DE) and represent both environmental isolates and type reference strains. Stock cultures of each strain were maintained in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0) containing 10-16% (vol/vol) glycerol and stored at -20°C. For each strain, individual 10 ml Brucella broth cultures were prepared (48 h, 42°C) in a microaerophilic environment (10% CO₂, 85% N₂, 5% O₂) and 0,1 ml subsamples of each was transferred to 30 ml of fresh Brucella broth and incubated as previously described.

The broth cultures were divided in two 15-ml aliquots and the cells from each pelleted by centrifugation (12 min. at 5 °C and 90,000×g), resuspended in 3 ml of sterile 0,1% peptone water (PW), pooled into a common tube (five strains), and centrifuged again as previously described. One half of the cell pellets were resuspended in 25 ml of trypticase soy broth (TSB) and the other half in 25 ml PBS (ca 10⁸ CFU/ml). Sterile (121°C /15 min) 5 cm² samples (coupons) of stainless steel and of a Formica™ countertop laminate, examples of typical food contact surfaces, were purchased from a local home supply store. One hundred µl of TSB and PBS *C. jejuni* suspensions were individually inoculated in the center of each coupon to yield a population of approximately 10⁷ CFU/cm². Each inoculated coupon was transferred to a sterile petri dish, covered with a filter paper lid to facilitate drying, and incubated at 26,7°C and 60-62% RH. Three coupons per contact surface and inoculum suspension (TSB and PBS) were sampled immediately after inoculation and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210, 225 and 250 min of incubation. Viable *C. jejuni* cells were recovered from the coupons using a rinse procedure. Each coupon was placed in a stomacher bag containing 4,9 ml of 0,1% PW and agitated for 2 min in an IUL Instruments Masticator (model No. 0400). This initial 1:50 dilution was agitated in a vortex mixer, serially diluted in PW,

and spiral plated in duplicate on Campy Cefex Agar. The plates were incubated for 48 h at 42°C in a microaerophilic environment and colonies enumerated. At the time of plating, 1 ml of the sample PW dilution was transferred to 8 ml of Campylobacter Enrichment Broth and incubated as previously described. Three to six trials were conducted for each coupon and suspension broth type. Survivor curves (log viable *C. jejuni* per ml of rinse versus time) were plotted for each trial and best-fit linear regression lines were determined. *D*-values (min) were calculated as the negative reciprocal of the survivor curve slope obtained by regression analysis. A mean *D*-value was calculated from the individual trial *D*-values.

Results

Examination of the survivor curves for the five-strain pool of *C. jejuni* in TSB on stainless steel surfaces revealed a biphasic curve that appeared to be related to the degree of desiccation of the 0,1 ml volume of inoculum on the coupon. No significant reduction in the *C. jejuni* population was detected over the first 90-min post inoculation. Between 90 and 120 min, the liquid area of the inoculum spot began to recede which led to a significant linear ($r = -0.98$) decrease in the *C. jejuni* population of approximately 7 logs over the next 105 min of incubation. No viable *C. jejuni* were recovered after 195 min. The mean decimal reduction time (*D*-value) under these storage conditions was 13.1 min. In contrast, survivor curves for *C. jejuni* cells suspended in PBS and then inoculated on the stainless steel coupons had a significantly different inactivation profile. Similar to the TSB survivor data, the population of viable *C. jejuni* organisms remained constant over the first 90 min post inoculation. This was followed by a linear ($r = -0.98$) decrease in population of nearly 4 logs from 90 to 225 min of incubation. The rate of cell inactivation was over two fold slower ($D = 29.5$ min) when the cells were suspended in PBS compared to TSB ($D = 13.1$ min). This finding was contrary to our original hypothesis where we speculated that *C. jejuni* cells suspended in a nutritionally enriched media such as TSB (analogous to more highly contaminated food preparation surfaces containing significant organic loads) would be protected from inactivation to a greater degree than cells suspended in a nutritionally inferior saline solution (PBS, example of a clean food preparation surface). Several factors may account for these findings. First, PBS may be a better support medium than TSB for maintaining the viability of *C. jejuni* under desiccation and aerobic conditions. A second explanation may be the presence of an inhibitor in

TSB that led to a greater inactivation of *C. jejuni* during storage. When inoculated onto a Formica™ countertop surface, *C. jejuni* cells suspended in TSB respond similarly to the stainless steel survivor data such that there was an initial lag phase of minimal cell death that extended out to about 165 min of incubation. This initial phase was followed by a rapid and linear ($r = -0.96$) decrease in *C. jejuni* population of about 6.7 logs from 165 to 225 min post inoculation. The mean *D*-value over the final 60 min of incubation was 8.7 min. The inoculum appeared to dry on the Formica™ surface at a slower rate than stainless steel. When suspended in PBS, *C. jejuni* cells that were inoculated on Formica™ surfaces were protected from the surrounding environmental conditions to a greater degree than when suspended in TSB. For example, when suspended in TSB, significant cell inactivation began between 165 and 180 min of incubation as opposed to between 195 to 210 min in PBS. Moreover, after 225 min of incubation, only a 1,4 log reduction in *C. jejuni* population was detected for cells suspended in PBS as opposed to a 6.7 log reduction after 210 min for cells suspended in TSB.

Discussion

These findings clearly demonstrate that both suspension media as well as food preparation surface composition can influence the survival and persistence of *C. jejuni*. In general, as food contact surfaces remain moist, *C. jejuni* can persist for extended periods of time. As surfaces dry, *C. jejuni* cell populations undergo a rapid decline that is dependent on the presence of organic and inorganic loads but still can be detected after approximately 180 to 210 min post contamination (3 to 3.5 h) in the case of cells suspended in TSB, to between 289 to 335 min (4.8 to 5.6 h) when suspended in PBS. Clearly there is sufficient time for *C. jejuni* cross contamination to occur between contaminated food contact surfaces and ready to eat foods that come in contact with these surfaces.

References

- 1) Brown, P., Kidd, D., Riordan, T., and Barrel, R.A. (1988). "An outbreak of foodborne *Campylobacter jejuni* infection and the possible role of cross contamination". J. Infect. Dis. 17, 171-176.
- 2) Coates, D., Hutchinson, D. N., Bolton, F. J. (1987). "Survival of thermophilic *Campylobacter* on fingertips and their elimination by washing and disinfection". Epidemiol. Infect. 99, 265-274.
- 3) Kotula, A. M. and Stern, N. J. (1984). "The importance of *Campylobacter* to the meat industry: a review". J. Animal Sci. 58, 1561-1566.

EFFICACIA DI UN VACCINO SOMMINISTRATO IN “OVO” CONTRO LA MALATTIA DI GUMBORO (IBD)

M. Coletti¹, E. Del Rossi¹, M.P. Franciosini¹, F. Passamonti¹, G. Tacconi¹, C. Marini²

¹ Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Perugia ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sede di Perugia

Parole chiave: vaccinazione in “ovo”, IBDV

Efficacy of an IBD vaccine administered in “ovo”

Key Words: in “ovo” vaccination, IBDV

Summary: Commercial chicks with IBD maternal antibody were vaccinated in the 18th day of incubation with a live IBD vaccine. This vaccine was also administered orally to 10 day-old chicks, from the same hatchery. On the 21th day, all subjects were experimentally infected with a virulent IBDV strain, causing serious changes of bursa of Fabricius of several chickens (edema, lymphocytic necrosis with significant presence of heterophils).

Correspondence: Coletti M. - Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia

Introduzione

La vaccinazione in “ovo”, al 18° giorno di incubazione, viene nel pollo utilizzata con successo nei confronti della malattia di Marek (7). Studi sono stati condotti per verificare la possibilità di impiego di questa tecnica per la profilassi di altre patologie del pollame ottenendo risultati a volte contrastanti (1,2,3,9).

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'efficacia di un vaccino vivo del commercio contro la malattia di Gumboro (IBD), dotato di patogenicità residua e somministrato al 18° giorno di incubazione ad embrioni commerciali.

Materiali e metodi

Pulcini. Sono stati impiegati n. 210 pulcini commerciali suddivisi nei seguenti 3 gruppi di 70 soggetti ciascuno:

- A : vaccinati in “ovo”, per via allantoidea, alla dose di 0,1 ml contenente 10^{3,5} PFU;

- B: vaccinati a 10 giorni di vita con lo stesso vaccino utilizzato nel gruppo A, diluito nell'acqua da bere secondo le indicazioni fornite dalla Ditta produttrice;

- C: controlli non sottoposti ad alcun trattamento di profilassi vaccinale.

Tutti i gruppi in esame sono stati tenuti separati in isolatori.

Piano sperimentale. A 1, 4, 7, 10, 14, 21, e 24 giorni di vita 10 soggetti per ogni gruppo sono stati, previo prelievo di sangue, sacrificati e da ciascuno animale è stata prelevata la borsa di Fabrizio. A 21 giorni tutti i volatili sono stati infettati per via oculo-congiuntivale con virus della malattia di Gumboro (IBDV) alla dose di 10^{2,50} EID₅₀.

Indagini istologiche e immunoistochimiche. Le borse di Fabrizio sono state utilizzate sia per esami istologici che immunoistochimici (immunoperossidasi), facendo ricorso in quest'ultimo caso alla tecnica descritta in un precedente lavoro (5).

Indagini immunoenzimatiche. Per la ricerca del virus nelle borse di Fabrizio è stato impiegato anche il test ELISA-capture (6). Gli anticorpi nei confronti di IBDV sono stati evidenziati utilizzando un kit ELISA (Flock Chek Infectious Bursal Disease, Idexx).

Risultati

Indagini istologiche, immunoistochimiche ed immunoenzimatiche. I risultati degli esami istologici, dell'immunoperossidasi, dell'ELISA-capture e del test ELISA nei tre gruppi presi in considerazione sono riportati nella tabella 1.

Discussione

Va innanzitutto sottolineato che la somministrazione del vaccino in ovo non ha determinato differenze sulla schiudibilità e sulla sopravvivenza dei pulcini, come riportato anche da Borzemska et al. (4).

Per quanto riguarda le alterazioni istologiche a carico delle borse di Fabrizio queste nel gruppo A si sono osservate a partire dal 4° giorno di vita e sono state caratterizzate prevalentemente da deplezione linfocitaria. Nel gruppo B questo tipo di lesione è stata rinvenuta dal 14° giorno di età, cioè 4 giorni dopo la vaccinazione contro IBDV. L'esame istologico delle borse di Fabrizio 3 giorni p.i., anche se in modo diverso, ha evidenziato, in tutti i gruppi, alterazioni riconducibili ad una forma acuta di IBD (necrosi linfociti, edema, presenza eterofili).

In seguito alla vaccinazione IBDV è stato riscontrato nelle borse di Fabrizio, sia con immunoperossidasi che con ELISA-capture, nel gruppo A fino al 4° giorno di vita e nel gruppo B solamente a 14 giorni di età. Ciò sta a dimostrare che le lesioni bursali, osservate prima dell'infezione sperimentale, sono riconducibili all'azione del virus vaccinale. Le stesse metodiche hanno consentito di evidenziare nei soggetti appartenenti ai tre gruppi a livello bursale IBDV 3 giorni p.i. A quest'epoca sono risultati maggiormente colpiti e con lesioni più gravi i pollastrelli del gruppo controllo e di quello vaccinato in ovo.

Per quanto riguarda la valutazione del titolo anticorpale nei confronti di IBDV, va sottolineato che alla nascita non ci sono state differenze significative tra vaccinati in ovo e non; successivamente nel gruppo A (vaccinato in ovo) si è osservato un calo degli anticorpi materni più rapido rispetto ai gruppi B e C. Nel gruppo B, sottoposto a vaccinazione a 10 giorni di vita, non si è verificato, come nel gruppo A, alcun incremento del titolo anticorpale conseguente al trattamento profilattico. Anche Van Den Berg e Meulemans (8) in pulcini di 14 giorni di età con anticorpi materni, utilizzando un vaccino simile, non sono riusciti a conferire una protezione al challenge.

Nelle nostre condizioni di sperimentazione pertanto la vaccinazione in ovo, in pulcini provvisti di anticorpi materni, non ha determinato una risposta anticorpale; ha inoltre causato lesioni alla borsa di Fabrizio, caratterizzate prevalentemente da deplezione linfocitaria, e non è stata in grado di proteggere

completamente gli animali da ulteriori alterazioni a livello bursale, indotte dall'infezione sperimentale.

Bibliografia

- Ahmad J., Sharma J.M. (1992) "Evaluation of a modified-live virus vaccine administered in ovo to protect chickens against Newcastle disease". Am. J. Vet. Res. 53 (11), 1999-2004.
- Avakian A.P., Whitfill C.E., Haddad E.E., Ricks C. (1993) "Efficacy of a novel infectious bursal disease (IBD) vaccine administered *in ovo* to broiler chickens". Poultry Sci. 72 (Suppl. 1), 49 (Abstr.).
- Avakian A.P., Whitfill C.E. (1999) "*In ovo* MD vaccines no threat to IB titres". World Poultry 15, 58-59.
- Borzemska W., Karpinska E., Kosowska G., Szeleszczuk P., Malicka E., Malec H. (1997) "Application of hatch diagrams for the evaluation of the harmlessness of vaccinal strains of the Gumboro disease virus using the *in ovo* method". Annals of Warsaw Agricultural University SGGW AR Veterinary Medicine 20, 117-123.
- Coletti M., Asdrubali G., Del Rossi E., Galli R., Giancristofaro P.C. (1994) "Studio di un ceppo vaccinale di IBDV dotato di patogenicità residua nel broiler: indagini istologiche ed immunostochimiche". Rivista di Avicoltura 3, 31-
- Franciosini M.P., Marini C., Galli R., Flores Rodas E.M. (1996) "Uso degli anticorpi monoclonali per la diagnosi virologica e sierologica della malattia di Gumboro". Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie L, 299-300.
- Sharma J.M., Burmester B.R. (1984) "Disease control in avian species by embryonal vaccination" U. S. Pat. Pat. 4,630.
- Van Den Berg T.P., Meulemans G. (1991) "Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination". Avian Pathology 20, 409-421.
- Wakenell P.S., Sharma J.M. (1986) "Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus". Am. J. Vet. Res. 47, 933-938.

Tabella 1: Risultati delle indagini istologiche, immunostochimiche ed immunoenzimatiche nei tre gruppi di pulcini

Table 1: Results of the investigations (histological, immunohistochemical and immunoenzymatic tests) conducted on the three groups of chicks

Gruppo	Indagini di laboratorio	Età in giorni						
		Numero soggetti con lesioni istologiche		Numero soggetti positivi per IBDV		Titoli anticorpali anti IBDV		
		1	4	7	10	14	21	24
A	L	0/10	8/10*	9/10*	7/10*	5/10*	6/10*	8/10++
	I	2/10	6/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/10
	EC	3/10	8/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/10
	EA	3.198	3.446	1.993 ^a	1.041	827	426	427
B	L	0/10	0/10	0/10	0/10	7/10	8/10	5/10++
	I	0/10	0/10	0/10	0/10	6/10	0/10	4/10
	EC	0/10	0/10	0/10	0/10	7/10	0/10	5/10
	EA	3.120	3.535	3.200 ^a	1.621	1.031	446	430
C	L	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10++
	I	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	8/10
	EC	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	9/10
	EA	3.409	3.732	3.521 ^a	1.709	1.366	81	99

L = Esame istologico borsa di Fabrizio. I = Immunoperossidasi borsa di Fabrizio

EC = ELISA-capture. EA = Titoli anticorpali medi anti IBDV espressi come media geometrica dei titoli individuali. * Deplezione linfocitaria. ++ Lesioni rappresentate da: edema, necrosi linfociti, infiltrazione eterofili. ^a Differenza significativa tra il gruppo A con i gruppi B e C (P≤0,05).

COMUNICAZIONE 10

STUDIO SULLA CONTAMINAZIONE DA CAMPYLOBACTER TERMOFILILI NELLA MACELLAZIONE INDUSTRIALE DEL TACCHINO

S. Perini¹, F. Paterlini¹, G. Meriardi¹, M. Dottori¹, D. Marzi², P. Prodi², M. Branchetti²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Sezione Provinciale di Reggio Emilia

²Azienda Unità Sanitaria Locale di Reggio Emilia, Distretto di Reggio Emilia

Parole chiave: tacchino, macellazione, igiene degli alimenti, *Campylobacter* sp.

Study of thermophilic *Campylobacter* contamination in turkey on slaughtering line

Key words: turkey, slaughtering, food hygiene, *Campylobacter* sp.

Summary: Thermophilic *Campylobacter*, cause of cases of alimentary infection in humans, has been searched in turkey on slaughtering line. The research was conducted on 6 homogeneous sets. Samples were represented by skin and intestinal swabs. Numbers of thermophilic *Campylobacter* on skin were high at the beginning of the line, peaked during evisceration, but dropped to very low levels after washing. Only one skin swab resulted positive for thermophilic *Campylobacter* from wings at the end of the line and no thermophilic *Campylobacter* was detected after 5 days of refrigeration. In intestines, duodenal tract resulted the most frequently infected and the intestinal carriers rate was equal to 58.3%.

Introduzione

Le specie enteropatogene del genere *Campylobacter* che vengono indicate con il termine "termofile" per la loro capacità di crescere a 43°C sono *C. jejuni*, *C. coli* e *C. laridis*. Le prime due presentano un profilo metabolico pressoché identico, fatta eccezione per la capacità di *C. jejuni* di idrolizzare l'ippurato. Le tre le specie sono ritenute potenziali agenti di gastroenterite umana (2, 4, 5, 6, 7). Questo studio si è proposto di verificare l'esistenza di una contaminazione da *Campylobacter* termofili nella macellazione industriale del tacchino.

Materiali e metodi

In un macello di tacchini, con capacità elevata (1.200 capi/ora) e annesso laboratorio di sezionamento, si sono analizzate le varie fasi della lavorazione per individuare eventuali punti di contaminazione. Sono stati eseguiti tamponi cutanei e prelievi di intestini su 6 partite uniformi di animali di diversa provenienza. Per ogni partita venivano eseguiti 20 tamponi cutanei, 4 per ciascuna delle seguenti fasi: dopo spennatura, dopo eviscerazione, dopo docciatura, sezionamento dopo la prevista refrigerazione a temperatura <4°C, conservazione ad 1°C per 5 giorni.

La campionatura è stata eseguita con tamponi di ovatta sterile che, dopo essere stati frizionati sulle superfici cutanee, venivano inseriti in provette di terreno selettivo liquido (*Campylobacter* Enrichment Broth: terreno liquido BHI, supplemento di crescita, Oxoid, supplemento selettivo secondo Karmali, Oxoid). Come indicato dalla bibliografia (1) la frequenza di isolamento risulta maggiore quando i tamponi vengono posti direttamente in terreni di crescita selettivi. Le provette di terreno selettivo venivano quindi immediatamente trasportate al laboratorio in condizioni di refrigerazione. Per ogni

partita si è proceduto inoltre al prelievo di 4 pacchetti intestinali che, trasportati al laboratorio, venivano campionati a diversi livelli (ansa duodenale, digiuno e cieco) tramite tamponi di ovatta sterili. Anche per questi prelievi il terreno di crescita era rappresentato da *Campylobacter* Enrichment Broth. Tutte le provette venivano quindi incubate alla temperatura di 43°C per 48 ore in microaerofilia utilizzando i sistemi del commercio. Al termine dell'incubazione si trasferiva una ansata di terreno liquido sulla superficie di due terreni selettivi solidi: Skirrow (Oxoid) e Karmali (Oxoid). Le piastre Petri venivano osservate dopo incubazione a 37°C per 48 ore e le colonie sospette venivano sottoposte a colorazione di Gram. Se si rilevavano piccoli bacilli Gram negativi con caratteristica morfologia a "virgola" si procedeva ad ulteriori prove biochimiche per la conferma di Genere.

Risultati

Nella tabella 1 sono riportati schematicamente i dati riferiti ai tamponi cutanei. I risultati ottenuti testimoniano un livello di contaminazione tutt'altro che trascurabile. Come si può notare la fase post eviscerazione è la più interessata dalla contaminazione a conferma dell'origine fecale della stessa. Una prevalenza elevata si nota anche nella fase post spennatura, mentre la contaminazione si riduce a livelli modesti nelle fasi successive alla docciatura ed alla refrigerazione.

I dati ottenuti dalle colture dei tamponi intestinali sono riportati nella tabella 2. Sono stati individuati complessivamente 14 soggetti portatori su 24 esaminati. Per tutti i 14 soggetti positivi è stato possibile isolare il germe dall'ansa duodenale mentre l'isolamento dal digiuno ha dato esito positivo in soli 3 dei 14 portatori. L'isolamento dal cieco è stato realizzato in un unico caso.

Tabella 1: Risultati degli esami colturali dei tamponi cutanei

Table 1: Results of skin swabs cultures

Fase	N° tamponi eseguiti	N° tamponi positivi	% di positività
spennatura	24	9	37,5
eviscerazione	24	13	54,1
docciatura	24	0	0
sezionamento dopo refrigerazione	24	1	4,1
conservazione ad 1°C per 5 giorni	24	0	0

Tabella 2: Risultati degli esami colturali dei tamponi intestinali

Table 2: Results of intestinal swabs cultures

	n° tamponi eseguiti	n° tamponi positivi	% di positività
ansa duodenale	24	14	58,3
digiuno	24	3	12,5
cieco	24	1	4,1
totale dei soggetti portatori		14	

Discussione

I dati raccolti attribuiscono alla fase post spennatura una prevalenza di contaminazione pari al 37,5%. Questo dato è presumibilmente da mettere in relazione sia alle contaminazioni della cute in allevamento o durante le fasi precedenti la

macellazione (ingabbiamento, trasporto, etc.) sia a contaminazioni crociate durante il transito delle carcasse nelle macchine spennatrici e nelle vasche di scottatura (8). Ad ulteriore conferma di quanto generalmente riportato in bibliografia (3) circa l'origine fecale della contaminazione delle carcasse da germi

del genere *Campylobacter*, abbiamo registrato un ulteriore picco nella prevalenza della contaminazione delle carcasse nella fase post eviscerazione. A questo livello della linea di macellazione la percentuale di tamponi positivi è passata dal 37,5% al 54,1%. Evidentemente questa fase è esposta al rischio di contaminazione fecale nonostante le garanzie igieniche offerte dal sistema di eviscerazione industriale. Il livello della contaminazione si abbatte nelle fasi successive alla docciatura, vale a dire sezionamento dopo refrigerazione e conservazione ad 1°C per 5 giorni. Probabilmente entra in gioco un effetto diluizione che diminuisce l'entità della contaminazione ad un livello inferiore alla sensibilità del metodo di isolamento impiegato. Nella fase di sezionamento è stata individuata una sola positività peraltro non più riscontrata dopo conservazione per 5 giorni a 1°C. Per quanto riguarda i tamponi intestinali, l'elevata percentuale di isolamento dal tratto duodenale (58,3%) indica che in questa sede i *Campylobacter* termofili trovano le condizioni di sviluppo più favorevoli. La localizzazione nei tratti più distali (digiuno e soprattutto cieco) è meno frequente, probabilmente in relazione a fenomeni di competizione batterica. Non è escluso che il sistema di isolamento impiegato non sia sufficientemente selettivo per assicurare l'isolamento del germe dai tratti distali dell'intestino. Dai dati raccolti si deduce che la macellazione industriale del tacchino è esposta alla contaminazione da *Campylobacter* termofili solo nelle sue fasi iniziali. I processi di docciatura e refrigerazione si dimostrano molto efficaci nell'abbattere la contaminazione. Inoltre la cottura,

indispensabile per il consumo della carne di tacchino, rappresenta un'ulteriore garanzia per la salubrità di tale alimento.

Bibliografia

1. Acuff G.R., Vanderzant C., Hanna M.O., Ehlers J.G., Golan F.A., Gardener F.A. (1985). "Prevalence of *Campylobacter jejuni* in turkey carcass processing and further processing of turkey products". *J. Food Prot.*, 49, (9), 712-717.
2. Blaser, M.J., I.D. Berkowitz, F.M. Laforce, J. Cravens, L.B. Reller, W.L. Wang (1979). "Campylobacter enteritis; Clinical and epidemiological features". *Ann. Intern. Med.*, 91, 179-185.
3. Berndtson E., Tivemo M., Engvall A. (1992). "Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens". *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 45-50.
4. Bruce D., Zochowsky W., Ferguson I.R. (1977). "Campylobacter enteritis". *Br. Med. J.* 2, 121.
5. Butzler J.P., Oosterom J. (1991). "Campylobacter: pathogenicity and significans in foods". *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 1-8.
6. Dzierkanowska D., Rozynek E. (1988). "Characteristics of the strains of *Campylobacter jejuni*-coli isolated from children in Poland". In *Campylobacter IV. Proceedings of the Fourth International Workshop on Campylobacter Infections* ed. Kajiser B. & Falsen E. pp106-107. Goteborg: University of Goteborg.
7. Griffiths p.I., Park R.W.A. (1990). "Campylobacters associated with human diarrhoeal disease". *J. Appl. Bacteriol.*, 69, 281-301.
8. Kwiatek K., Wojton B., Stern N.J. (1990). "Prevalence and distribution of *Campylobacter* spp. on poultry and selected red meat carcasses in Poland". *J. Food Prot.*, 53, (2), 127-130.

COMUNICAZIONE 11

EFFICACIA CLINICA E INNOCUITÀ D'USO DEL PARACOX-5, VACCINO VIVO ATTENUATO CONTRO LE COCCIDIOSI DEL POLLO DA CARNE

Gobbi L.

Schering-Plough Animal Health, Segrate (MI)

Parole chiave: coccidiosi, profilassi vaccinale, linee "precoci" di *Eimeria* spp.

Clinical efficacy and safety of Paracox-5, live attenuated Coccidiosis vaccine in broiler birds

Key words: coccidiosis, vaccinal prophylaxis, *Eimeria* spp. attenuated for precocity

Summary: An attenuated vaccine against 5 species of *Eimeria* was tested in broiler birds, reared in 19 (males) and 22 (females) separate sites. A total of about 1.5 million of birds were vaccinated, while the controls were considered those flocks (4-5 groups) placed prior to this trial in the same premises. The vaccine proved as effective as any of the tested coccidiostat programs in controlling infection and preventing clinical signs or mortality due to Coccidiosis. Vaccination had no observable effect on appearance and behavior of the birds, nor on growth rates, FCRs and overall mortality.

Correspondence: L. Gobbi, Schering-Plough Animal Health, Centro Direzionale Milano Due, Palazzo Borromini - 20090 Segrate (MI)

Introduzione

L'impiego dei coccidiostatici nell'alimento è stato per molti anni il solo metodo valido nel controllo delle Coccidiosi del pollo da carne.

Tali sostanze, pur svolgendo tuttora un ruolo primario nel sostenere con profitto la produzione avicola mondiale, non sono del tutto scesvre da problemi d'uso. Infatti, fenomeni di resistenza insorgono sempre più frequentemente non solo nei confronti di quelle molecole già utilizzate da molti anni, ma anche per quei coccidiostatici di più recente utilizzo (1).

Inoltre, non vanno dimenticati gli effetti indesiderati, rappresentati da quadri tossici conseguenti a

iperdosaggio o errato impiego (2) e soprattutto vi è il rischio sempre incombente di un loro residuo nelle carni degli animali macellati.

Sono queste le ragioni che negli anni più recenti hanno indirizzato la Ricerca sullo studio delle difese immunitarie indotte e soprattutto dei vaccini nei confronti delle Coccidiosi del pollo (4, 5).

Molti tentativi sono stati fatti in tal senso, ma a tutt'oggi i risultati più confortanti sono stati ottenuti in animali sottoposti a immunizzazione attiva con vaccini costituiti da oocisti sporulate, appartenenti a linee "precoci" (attenuate) delle principali specie di *Eimeria* responsabili di infezione nel pollo (3, 6). Queste linee

“precoci” sono caratterizzate dalla riduzione del tempo di prepatenza e quindi del grado di moltiplicazione nelle strutture dell'epitelio intestinale, ma soprattutto dall'attenuazione della loro patogenicità intrinseca.

Materiali e Metodi

Si è utilizzato un vaccino (Paracox-5), costituito da una sospensione acquosa di oocisti sporulate delle 5 principali specie di *Eimeria* patogene per il pollo *broiler* (*E. acervulina*, HP, *E. maxima* CP, *E. maxima* MFH, *E. mitis* HP, *E. tenella* HP), opportunamente attenuate mediante selezione delle linee genetiche “precoci”.

La somministrazione nel primo giorno di vita è stata realizzata mediante distribuzione a spray sull'alimento o a spray in incubatoio, utilizzando pulcini di razze da carne tipo *broiler*, maschi e femmine e ricorrendo a protocolli d'impiego largamente collaudati in precedenti studi controllati.

La presente sperimentazione ha coinvolto all'incirca 1,5 milioni di animali, metà maschi e metà femmine, distribuiti rispettivamente in 19 e in 22 differenti siti di allevamento, condotti managerialmente secondo più moderni indirizzi della tecnica avicola.

Come animali di controllo e confronto sono stati utilizzati quei soggetti allevati in precedenza (4-5 cicli di produzione) negli stessi ricoveri aziendali. L'unica differenza tra animali vaccinati e di controllo era costituita dall'alimentazione in questi ultimi con mangimi contenenti coccidiostatici, impiegati secondo il programma “shuttle”.

In tutti i gruppi di animali vaccinati o di controllo la mortalità è stata rilevata giornalmente così come lo stato sanitario generale, mentre a fine ciclo sono stati determinati i parametri zootecnici più significativi (incremento giornaliero medio, indice di conversione medio, mortalità totale).

Inoltre, negli animali vaccinati e con cadenza settimanale si è proceduto alla pesata di un numero rappresentativo di polli a campione, alla raccolta di feci per la determinazione in laboratorio della quantità di oocisti presenti; infine, su base occasionale sono stati sottoposti a esame anatomo-patologico completo un certo numero di animali trovati morti o sacrificati in fase pre-agonica. Il test del CHI-quadro è stato impiegato per l'analisi statistica della mortalità totale mentre il consumo di alimento per pollo e l'indice di

conversione medio sono stati analizzati mediante test ANOVA.

Risultati

Nella figura 1 e nella tabella 1 vengono rispettivamente indicati i valori della conta delle oocisti nelle feci degli animali vaccinati e i valori dei principali parametri zootecnici sia nei vaccinati che nei controlli. Le pesate di animali vaccinati a giorni prefissati (21°-28° e 35° nelle femmine; 21°-28°-35°-49° e 56° nei maschi) hanno evidenziato valori medi perfettamente in linea con le curve di accrescimento standard per quella razza e tipo di polli allevati.

Nei polli vaccinati non si è osservato, inoltre, alcunché di anormale nei 15 giorni post-vaccinazione e ascrivibile alla somministrazione del Paracox-5.

Conclusioni

I risultati della sperimentazione hanno dimostrato che il Paracox-5 è efficace nella profilassi immunizzante delle Coccidiosi del pollo da carne, in quanto il vaccino ha impedito l'insorgenza sia delle forme cliniche che di quelle sub-cliniche di malattia specifica e senza indurre effetti collaterali di alcun tipo. Al pari dei gruppi di controllo trattati con coccidiostatici, negli animali vaccinati si sono ottenuti validi risultati relativi ai parametri zootecnici, in quanto il raffronto statistico ha rilevato un numero minimo di allevamenti con valori statisticamente differenti rispetto ai valori numerici degli animali di controllo, quindi con una casualità del tutto naturale e ascrivibile alla normale variabilità biologica.

Bibliografia

1. Chapman H.D. (1993) “Resistance to anticoccidial drugs in fowl”. *Parasitology Today*, 9, 5, 159-162.
2. Dowling L. (1992) “Ionophore toxicity in chickens: a review of pathology and diagnoses”. *Avian Pathology*, 21, 355-368.
3. Gobbi L. (2000) “Safety and efficacy evaluation of Paracox-5 in meat chickens” Schering-Plough Animal Health Report 98013-020-R.
4. Lillehoj H.S. & Trout J.M. “Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development”. *Avian Pathology*, 22, 3-31.
5. Long P.L. & Rose M.E. (1982) “Prospects for control of Coccidiosis by immunization” *World Poultry Science Journal*, 38, 85-96.
6. Williams R.B., Carlyle W.W.H., Bond D.R., Brown I.A.G. (1999) “The efficacy and economic benefits of Paracox Coccidiosis vaccine in chickens”. *International Journal for Parasitology* 29, 341-355.

Figura 1: Conta delle oocisti nelle feci

Figure 1: Faecal oocyst counts

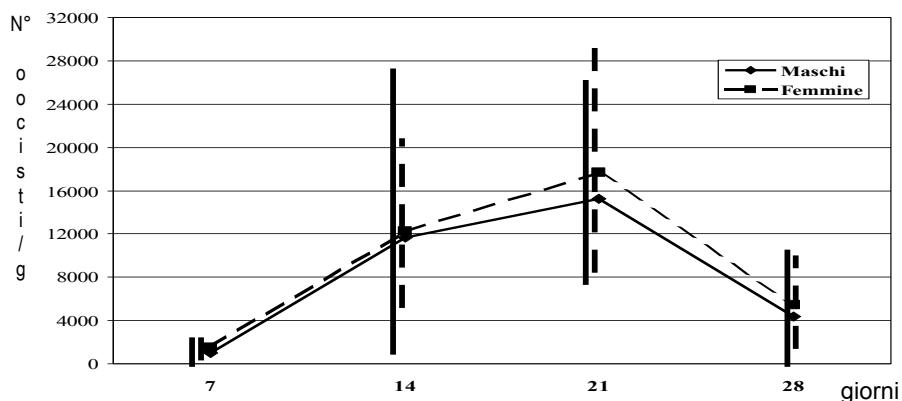


Tabella 1: Risultati e analisi statistiche
Table 1: Results and statistical analysis

Parametri Zootecnici	N° di allevamenti con valori statisticamente differenti			
	Maschi		Femmine	
Consumo di alimento per pollo	+ 0/19	- 0/19	+ 4/22	- 0/22
Indice di conversione medio	+ 0/19	- 0/19	+ 0/22	- 0/22
Mortalità totale	+ 0/19	- 1/19	+ 2/22	- 2/22

Nota: i segni + e – indicano rispettivamente, per quegli allevamenti con valori statisticamente differenti, se il dato è maggiore o minore rispetto ai valori medi degli animali di controllo.

COMUNICAZIONE 12

ISOLAMENTO, TIPIZZAZIONE E CONSIDERAZIONI SULLA PATOGENICITA' DI ORTHOMYXOVIRUS E PARAMYXOVIRUS ISOLATI IN ROMAGNA NELL'ANNO 2000

P. Massi, G. Tosi, F. Paganelli, L. Fiorentini, A. Moreno Martin
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Parole chiave: Orthomyxovirus, Paramyxovirus, volatili, suino, patogenicità

Isolation, characterisation and pathogenicity of Orthomyxovirus and Paramyxovirus isolated in Romagna during 2000

Key words: Orthomyxovirus, Paramyxovirus, pathogenicity, poultry, swine

Summary: isolation and typing of Orthomyxovirus and Paramyxovirus from different avian species and swine during 2000 in Romagna region are described. Hypothesis about diffusion of pathogenic strains are discussed.

Correspondence: Massi P. - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1 – 47100 Forlì. Email forli@bs.izs.it

Introduzione

A partire dal 1999 si è verificata una grave epidemia di influenza aviaria (sottotipo H7N1) nel Nord Italia. Questa emergenza sanitaria ha creato viva preoccupazione in tutto il territorio nazionale. In particolare, la regione Emilia Romagna ha attuato dei piani di monitoraggio virologico e sierologico su vasta scala nei confronti dei virus influenzali, a cui si sono aggiunti i controlli conseguenti alla recente comparsa di focolai di pseudopeste in alcune zone della Romagna. Nell'ambito di tali indagini sono stati isolati, presso la sezione di Forlì dell'IZSLER, alcuni ceppi di orthomyxovirus e paramyxovirus da diverse specie aviarie e dal suino. Nel presente lavoro sono riportati i risultati della tipizzazione di tali ceppi e alcune considerazioni epidemiologiche sulla loro diffusione in ambito regionale.

Materiali e metodi

- 1) Isolamento del virus su uova embrionate SPF inoculate per via intra-allantoidea.
- 2) Ricerca dell'antigene influenza di tipo A nel liquido allantoideo mediante ELISA.
- 3) Valutazione dell'attività emoagglutinante (H.A.) del liquido allantoideo.
- 4) Valutazione dell'inibizione dell'emoagglutinazione (H.I.) su liquido allantoideo mediante l'impiego di antisieri specifici nei confronti dei virus influenzali (sottotipi H1, H2, H3, H5, H6, H7, H9) e dei paramyxovirus (sierotipi PMV1, PMV2, PMV3, PMV3 variante 449, PMV4).
- 5) Immunofluorescenza diretta su MCA con antisiero specifico per PMV1.
- 6) Microscopia elettronica su liquido allantoideo.

- 7) Prove di patogenicità endovenosa o intracerebrale (I.P.I.C.) eseguite presso il centro di referenza nazionale (IZS Padova).

Risultati e discussione

Come si può osservare nella tabella 1, in Romagna sono stati isolati soltanto due ceppi di virus influenzale H7N1 nonostante la vicinanza geografica e i numerosi scambi commerciali con le regioni del Nord Italia in cui l'influenza aviaria ha colpito pesantemente il patrimonio avicolo. Risulta interessante l'isolamento di un ceppo H3N8 da pappagallini ondulati durante il periodo di quarantena conseguente alla loro importazione dalla Cina. Ci è sembrato opportuno segnalare l'isolamento di virus dell'influenza suina al fine di controllare la circolazione di vari sottotipi e di evidenziare la possibilità di una loro ricombinazione; è noto, infatti, il ruolo centrale svolto dal suino nei fenomeni di riassortimento genetico dei virus influenzali con la possibile comparsa di nuovi sottotipi e il loro adattamento a nuove specie.

La presenza di ceppi di virus della malattia di Newcastle è stata invece segnalata a partire dai primi mesi del 2000 in piccioni, fagiani e tortore. Inizialmente i ceppi isolati hanno presentato indici di patogenicità bassi o medio-bassi. Improvvisamente, nei mesi di Maggio e Giugno (Tabella 3), è comparsa la malattia in allevamenti intensivi di broilers, pollastre e faraone; tutti i ceppi isolati hanno presentato le caratteristiche tipiche dei ceppi velogeni e I.P.I.C molto elevati (1,9-2). Da parecchi anni la pseudopeste aviaria non si manifestava con tale gravità nella nostra regione. Si potrebbe ipotizzare l'importazione di ceppi patogeni da paesi con i quali, a causa dell'epidemia di influenza, si sono intensificati gli scambi commerciali.

Infine, più per conoscenza scientifica che per la formulazione di ipotesi epidemiologiche, si è voluta segnalare la presenza di paramyxovirus di tipo 2 e 3 in uccelli selvatici e da voliera (Tabella 2).

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa collaborazione i tecnici di laboratorio dei reparti di sierologia e virologia della Sezione IZS di Forlì.

Bibliografia

- Alexander D.J. (1989) "Newcastle Disease" in: American Association of Avian Pathologists: A Laboratory manual

Tabella 1: Ceppi di virus influenzali isolati nel 2000 in Romagna

Table 1: Influenza strains isolated in Romagna during 2000

Mese	Sottotipo	Specie
Gennaio	H7N1 bassa pat.	Tacchino
	H7N1 alta pat.	Pollo
	H1N2	Suino
	H3N2	Suino
Marzo	H1N1	Suino
Aprile	H3N8	Pappagallino ondulato

Tabella 2: Ceppi di PMV non-1 isolati nel 2000

Table 2: PMV non-1 strains isolated during 2000

Mese	Sierotipo	Specie
Febbraio	PMV3 variante 449	Passero*
Marzo	PMV3 variante 449	Barbagianni
Giugno	PMV2 (Yucaipa)	Passeriformi*

*isolati presso l'IZSLER di Brescia

for the Isolation and identification of Avian Pathogens. Kendall/Hunt Publishing Company 114-120.

- Alexander D.J. (1993) "Paramyxovirus infection" in: Mc Ferran J.B. and Mc Nulty M.S.: Virus Infections of Birds. Elsevier Science Publishers 321-340.
- Easterday B.C., Hinshaw W.S., Halvorson D.A. (1997) "Influenza" in: Calnek B.W.: Diseases of Poultry 10th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa 583-606.
- Webster R.G. (1997) "Influenza virus: transmission between species and relevance of the next human pandemic". Arch. Virol., 13, 105-113.

Tabella 3: Ceppi di PMV1 isolati nel 2000 in Romagna

Table 3: PMV 1 strains isolated during 2000 in Romagna

Mese	Sottotipo	Specie	I.P.I.C.
Gennaio	4 ceppi di PMV1 "ceppo piccione"	Piccione	0.7, 0.67, 0.55, 0.80
Febbraio	4 ceppi di PMV1 "ceppo piccione"	Piccione	0.88, 0.6, 1.2, 0.6
	1 ceppo PMV1	Fagiano	0.1
Aprile	PMV1	Tortora	1.1
	PMV1	Pollo	0.95
Maggio	PMV1	Pollo	1.9
	PMV1	Pollo	2.0
	PMV1	Pollo	Alta pat.*
	PMV1	Pollo	Alta pat.
	PMV1	Faraona	Alta pat.
Giugno	PMV1	Pollo	Alta pat.

*Patogenicità caratterizzata mediante anticorpi monoclonali

COMUNICAZIONE 13

INTOSSICAZIONE DA TRICOTECENI E DERMATITE PLANTARE DA *Staphylococcus epidermidis* IN POLLI DA CARNE

P. Massi¹, G. Tosi¹, R. Fagioli²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì

²Veterinario aziendale

Parole chiave: tricoteceni, *Fusarium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, broilers

Trichothecenes mycotoxicosis and plantar dermatitis caused by Staphylococcus epidermidis in broilers

Key Words: trichothecenes, *Fusarium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, broilers

Summary: A case of trichothecenes mycotoxicosis in young broiler chickens is reported. Necropsied birds showed necrotic lesions of the oral mucosa and plantar skin suggestive of trichothecenes toxicosis. Plantar dermatitis was complicated by *Staphylococcus epidermidis* infection. Morbidity index 100%. The authors report the effects of the disease and the therapeutics measures adopted.

Correspondence: Massi P. – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1, 47100 Forlì – Email forli@bs.izs.it

Introduzione

I tricoteceni sono metaboliti prodotti prevalentemente da miceti del genere *Fusarium*. Tra le oltre 100 micotossine appartenenti a questo gruppo, la T2, il Diacetoxiscirpenolo (DAS) e il deoxinivalenolo (DON o vomitossina) spiccano per la loro attività patogena legata ad un'azione caustica a livello di cute e mucose (2). Ne conseguono lesioni di tipo necrotico-ulcerativo (spesso complicate da infezioni secondarie) oltre ad

una dimostrata attività immunodepressiva (4). Il presente lavoro descrive un caso di fusariosi in polli da carne di età molto giovane e caratterizzato da un elevatissimo indice di morbilità.

Materiali e metodi

20 broilers di razza Cobb erano conferiti al laboratorio. Dopo la raccolta dei dati anamnestici, i soggetti erano sottoposti ad eutanasia e alle seguenti prove di laboratorio:

1. esame anatomico-patologico;
2. esame batteriologico da visceri e cute prelevati in sede necroscopica. Le prove venivano eseguite sui seguenti terreni colturali: agar sangue, agar Hektoen, agar Sabouraud;
3. esami sierologici: sieroagglutinazione rapida ed ELISA per la ricerca di anticorpi nei confronti di *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, ELISA per reovirus e bronchite infettiva, inibizione dell'emoagglutinazione per virus della malattia di Newcastle;
4. esame istopatologico da organi sede di lesioni;
5. esame al microscopio elettronico in colorazione negativa del contenuto intestinale.

Risultati

Anamnesi: broilers di razza Cobb di 10 giorni di età (consistenza del gruppo: 90000 capi); all'esame clinico i soggetti presentavano anoressia, scarso accrescimento, difformità di sviluppo, alterazioni del piumaggio, zoppie; l'indice di mortalità era trascurabile, mentre la morbilità raggiungeva in pochi giorni un indice del 100%. I soggetti erano allevati su lettiera di paglia.

Rilievi necroscopici: tutti i soggetti esaminati presentavano lesioni di tipo necrotico-crostoso sulla mucosa orale e lungo il margine inferiore del becco (Figura 1). Asportando l'essudato necrotico si osservava la presenza di ulcere mucosali. Nel 50% degli animali esaminati si evidenziava una dermatite plantare di tipo necrotico-ulcerativo (Figura 2). Si rilevava inoltre un'enterite catarrale associata a proventriculiti con stomaci vuoti e tendenti all'erosione della mucosa.

Rilievi di laboratorio: l'esame batteriologico delle lesioni orali rivelava la presenza di miceti, lieviti e di una flora batterica polimorfa. A livello plantare era isolato, in purezza, un ceppo di stafilococco tipizzato (mediante prove biochimiche in micrometodo) come *Staphylococcus epidermidis*. L'esame al microscopio elettronico del contenuto intestinale non rilevava la presenza di forme virali. All'esame istopatologico le lesioni ulcerative erano caratterizzate da tessuto di granulazione e cellule infiammatorie ed erano ricoperte di essudato, cellule batteriche e residui di alimento. Gli esami sierologici evidenziavano bassi titoli anticorpali (residuo dell'immunità materna) nei confronti di tutti gli agenti infettivi testati.

Rilievi in allevamento e interventi adottati: l'analisi del mangime non metteva in evidenza quantità significative di miceti e di tricoteceni, mentre la carica micotica della lettiera raggiungeva valori molto alti (680.000 ufc/gr) a conferma di una pessima qualità

della stessa che, all'esame visivo, si presentava molto umida e di colore scuro. Il gruppo colpito veniva trattato con iodio in acqua da bere, mentre sulla lettiera veniva distribuita una soluzione di solfato di rame allo 0.1%. La prevalenza della malattia si riduceva al 15% dopo 4 giorni dall'inizio della terapia e si azzerava dopo 7 giorni. Grazie alla tempestività d'intervento i danni economici erano limitati e quantificabili in 60 gr. di peso vivo rispetto agli standard di allevamento (valore calcolato al ritiro delle femmine).

Discussione

L'indagine clinica e i risultati di laboratorio non lasciano dubbi sull'eziologia del caso in esame e sulla lettiera come fonte di contaminazione. I tricoteceni agiscono come potenti inibitori della sintesi proteica e degli acidi nucleici a carico delle cellule in attiva moltiplicazione (1). Ne consegue un'attività necrotica su tutti i tessuti che vengono in contatto con la micotossina (cute, mucose dell'apparato digerente, follicoli delle penne) e sulle cellule del midollo osseo (con conseguente anemia e immunodepressione) (3). I tricoteceni hanno una diffusione cosmopolita e sono stati rilevati in numerose materie prime vegetali (mais, frumento, orzo, sorgo, soia). La produzione della tossina è favorita da alti valori di umidità e da temperature comprese tra 6° e 24°C. La presenza di muffe non è direttamente collegabile alla produzione della tossina; tuttavia un'elevata carica micotica nell'alimento o nella lettiera rappresenta un sensibile indicatore di una potenziale contaminazione. Gli interventi terapeutici consentono una rapida regressione della malattia purchè vengano eseguiti tempestivamente. Il controllo dell'alimento e una corretta gestione della lettiera costituiscono i principali metodi di prevenzione.

Bibliografia

- 1) Leeson S., Diaz G.J., Summers J.D. (1995) "Poultry metabolic disorders and mycotoxins". University Books, Guelph, Ontario, Canada.
- 2) Pittet A. (1998) "Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review". *Revue Méd.Vét.*, 149, 479-492
- 3) Ziprin R.L., Elissalde M.H. (1990) "Effect of T2 toxin on resistance to systemic Salmonella typhimurium infection of newly hatched chickens". *Am.J.Vet.Res.*, 51, 1869-1872.
- 4) Wyatt R.D., Weeks B.A., Hamilton P.B., Burmeister H.R. (1972) "Severe oral lesions in chickens caused by ingestion of dietary fusariotoxin T2". *Appl.Micrbiol.*, 24, 251-257.

AGGIORNAMENTI SULLA BURSITE INFETTIVA (IBD) IN ROMAGNA: OSSERVAZIONI EPIDEMIOLOGICHE E PATOLOGIE COMPLICANTI

G Tosi, P. Massi, L. Fiorentini

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì.

Parole chiave: bursite infettiva, enterite necrotica, pollo da carne, pollastre, galli livornesi

Infectious bursal disease (IBD) in Romagna region: an update. Epidemiological data and secondary diseases.

Key words: Infectious Bursal Disease, necrotic enteritis, broilers, layer pullets, leghorn cockerels.

Summary: some cases of Infectious Bursal Disease observed in 2000 in Romagna region are described. Anamnestic data and results of laboratory investigations are reported. The authors underlines the immunodepressive effects of IBDV infection in different genetic lines. Some observations about vaccination programs and biosecurity are included.

Correspondence: Tosi G. - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1, 47100 Forlì – Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Da alcuni anni la bursite infettiva (IBD) è presente in forma endemica in Romagna. Analogamente ad altri paesi europei, i ceppi virali circolanti nel territorio della nostra regione appartengono al gruppo dei “very virulent (vvIBDV)” (2). Questi ultimi sono in grado di provocare malattia clinica (con alti indici di mortalità) e di colonizzare la borsa di Fabrizio (principale organo di replicazione del virus) in presenza di elevati titoli anticorpali di origine materna riuscendo in tal modo a precedere i ceppi vaccinali i quali sono neutralizzati dall'immunità passiva trasmessa dai riproduttori (4). Per contrastare i vvIBDV sono stati allestiti vaccini meno attenuati in grado di competere con i ceppi patogeni (1). Occorre tuttavia ricordare che il grado di attenuazione dei vaccini è inversamente proporzionale alla loro attività immunodepressiva.

L'enterite necrotica (EN) da *Clostridium perfringens* tipo A (più raramente da tipo C) è una delle patologie batteriche più diffuse nel broiler; essa è osservata anche in galli, pollastre e galline ovaiole. Sono state avanzate varie ipotesi per spiegare l'aumento dell'incidenza di questa malattia (tra cui il divieto di somministrazione di alcuni farmaci ad azione auxinica). E' invece una certezza il ruolo svolto dalle patologie immunodepressive (tra cui la bursite infettiva) nel condizionare la comparsa della EN. Scopo del presente lavoro è descrivere i casi più significativi di IBD osservati nel 2000 in Romagna con particolare riferimento ai piani vaccinali adottati e alle complicazioni batteriche diagnosticate, tra cui, appunto, l'EN.

Materiali e metodi

Soggetti con sintomi clinici o deceduti erano conferiti al laboratorio e, dopo la raccolta dei dati anamnestici, erano sottoposti alle seguenti prove di laboratorio:

1. esame anatomo-patologico;
2. esame virologico su uova embrionate SPF inoculate per via intra-allantoidea;
3. microscopia elettronica su liquido allantoideo;
4. agar-gel precipitazione su membrana corion-allantoidea con siero specifico IBDV;
5. esami batteriologici sugli organi sede di lesione; per le prove venivano impiegati i seguenti terreni colturali: agar sangue, agar Hektoen, Cooked Meat Medium;

6. esame microscopico a fresco del contenuto intestinale per la ricerca di forme protozoarie ed elmintiche.

Risultati

Rilievi necroscopici: in tutti i casi esaminati gli animali presentavano lesioni tipiche da IBD (emorragie muscolari, bursite edematoso-emorragica, splenomegalia, nefrite) (Figura 1). In entrambi i gruppi di pollastre veniva riscontrata un'enterite necrotico-ulcerativa (Figura 2 e 3) associata a lesioni necrotiche variegata e diffuse nel parenchima epatico.

Rilievi di laboratorio: in tutti i casi considerati era isolato il virus della bursite infettiva. Dai soggetti con enterite necrotica erano inoltre isolati ceppi di *Clostridium* spp. Successivamente tipizzati (mediante prove biochimiche in micrometodo) come *C.perfringens*.

Conseguenze nei gruppi colpiti e interventi adottati: nei galli livornesi la mortalità da IBD persisteva per 7 giorni. In seguito il gruppo non presentava complicazioni secondarie. Nei broilers i segni clinici da IBD si diffondevano in un altro capannone. Altri tre gruppi vicini erano vaccinati “d'urgenza” con un ceppo “intermedio-plus” e non manifestavano, in seguito, segni di malattia. Nei gruppi di pollastre compariva un'ulteriore complicazione batterica (colisetticemia).

Conclusioni

Nella valutazione dei casi descritti bisogna considerare la diversa sensibilità all'infezione da IBDV delle linee genetiche allevate, l'età degli animali e i diversi programmi vaccinali adottati. Appare evidente la maggiore sensibilità delle linee leggere all'infezione da IBDV, testimoniata dalla comparsa di gravi complicazioni secondarie. E' da sottolineare la precoce apparizione della malattia nei broilers, in anticipo rispetto al primo intervento vaccinale programmato. Desto interesse l'impiego di ceppi “intermedi-plus” in zone ad alto rischio di malattia o addirittura come vaccinazione d'emergenza in gruppi vicini al focolaio. La notevole variabilità dei programmi di profilassi immunizzante è indice di una certa difficoltà nella scelta del ceppo vaccinale e dell'età di somministrazione. Il monitoraggio degli anticorpi materni alla nascita e il calcolo del tempo medio di scomparsa degli stessi potrebbe fornire uno strumento oggettivo per risolvere tale problema (3). Nel complesso la IBD, pur ripresentandosi ogni anno

(soprattutto nei mesi estivi), ha assunto ultimamente caratteri di minore gravità. A tale riguardo va sottolineato il ruolo fondamentale della profilassi igienico-sanitaria nel controllo della malattia.

Bibliografia

1. Kouwenhoven B., Van den Bos J. (1994) "Control of very virulent Infectious Bursal Disease in the Netherlands with more virulent vaccines". In: "Proceedings of the international symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anemia", Rauischolzhausen, Germany, 262-271.
2. Tosi G., Massi P., Pavesi M., Meini A. (1997) "Osservazioni sull'andamento della bursite infettiva del pollo in Italia e preliminare tipizzazione di alcuni ceppi virali di campo". *La Selezione Veterinaria*, 8-9, 631-636.
3. Van den Berg T.P., Meulemans G. (1991) "Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination". *Avian Pathology*, 20, 409-421.
4. Van den Berg T.P., Gonze M., Morales D., Meulemans G. (1996) "Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain". *Avian Pathology*, 25, 751-768.

Tabella 1: Dati anamnestici dei casi esaminati.

Table 1: Anamnestic data of the examined cases

Tipo di allevamento	Età	Indice di mortalità*	Piano vaccinale per IBDV
Broilers	13 gg	10%	Nessuno
Pollastre	40 gg	20%	14 gg (ceppo "intermedio")
Pollastre	35 gg	10%	18 gg (ceppo "intermedio-plus")
Galletti livornesi	35 gg	5%	12 e 21 gg (ceppi "mild")

*al momento del conferimento al laboratorio.

COMUNICAZIONE 15

ANALISI DEI RISULTATI DI UN ANNO DI SORVEGLIANZA SIEROLOGICA DEL SIEROTIPO 793B DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA (IBV)

G. Tosi¹, A. Meini², P. Massi¹, G. Cislighi²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì

²Intervet Italia S.r.l.

Parole chiave: bronchite infettiva aviare, sierotipo 793B, inibizione dell'emoagglutinazione (HI), prevalenza

A serological survey of the presence of the infectious bronchitis virus serotype 793B in Italy: results of the last year

Key Words: infectious bronchitis virus, serotype 793B, haemagglutination inhibition (HI), prevalence

Summary: this study presents the results of serological survey to confirm the presence of IBV 793B infection in Italy. On the basis of the demonstration of specific antibodies in sera, infectious bronchitis virus serotype 793B has been shown to be present in broiler, breeder and layer flocks of chickens in many parts of Italy.

Correspondence: Tosi G. - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1, 47100 Forlì – Email forli@bs.izs.it

Introduzione

La bronchite infettiva (IB) è una delle principali cause di perdita economica dell'industria avicola. L'infezione è caratterizzata da elevata morbilità e rapida diffusione nel territorio; la malattia clinica si esprime con forme respiratorie, nefrite-nefrosi, calo di ovodeposizione e alterazioni della qualità del guscio. L'Italia è circondata da paesi, con i quali ha strette relazioni commerciali, in cui è dimostrata la presenza del sierotipo 793B (2) e che vaccinano attivamente nei suoi confronti con un vaccino vivo attenuato. Il presente studio espone sinteticamente i risultati di un anno di monitoraggio sierologico relativo a IBV effettuato dall'IZSLER di Forlì allo scopo di valutare la prevalenza dell'infezione sostenuta da sierotipo 793B.

Materiali e metodi

Nel periodo Giugno 1999 – Giugno 2000 sono pervenuti al laboratorio, per la sierodiagnosi di IBV, 3812 sieri provenienti da 229 allevamenti di vario tipo (broilers, galletti, pollastre e galline da consumo e da riproduzione). I campioni giungevano dalle seguenti regioni: Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Abruzzo, Sicilia. Trattandosi di conferimenti per scopi diagnostici, il numero dei

soggetti testati per ogni gruppo non era preventivamente programmato. Ad ogni modo venivano esaminati perlomeno 20 campioni/gruppo. Le prove di laboratorio venivano eseguite mediante inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (1) e ogni siero veniva testato con gli antigeni dei seguenti sierotipi: M41 (Central Veterinary Laboratory – Weybridge), D274 (Intervet – Olanda), 1466 (Intervet – Olanda) e 793B (Central Veterinary Laboratory – Weybridge). I risultati venivano espressi come la più alta diluizione del siero in esame in grado di inibire l'emoagglutinazione. Nei gruppi non vaccinati si considerava significativa una sieropositività $\geq 1/512$ nei confronti del sierotipo 793B. Nei gruppi vaccinati con vaccini inattivati, a tale parametro veniva associato il confronto con gli altri sierotipi, per cui si riteneva significativa una sieropositività $\geq 1/512$ nei confronti del sierotipo 793B purchè superiore di almeno due diluizioni a quella degli altri sierotipi

Risultati e Discussione

La diagnosi dell'infezione da IBV con metodiche tradizionali si basa sull'isolamento del virus e sulla valutazione della risposta anticorpale.

L'interpretazione dei dati sierologici, tuttavia, è condizionata da numerosi fattori: età e linea genetica degli animali, immunità passiva materna, piani vaccinali, presenza di altri tipi di immunità non svelabili sierologicamente (locale, cellulo-mediata), diffusione di sierotipi diversi nel medesimo territorio e reazioni crociate tra gli essi (4). Per quest'ultimo motivo nel presente studio è stata adottata la metodica HI. Si tratta di un test considerato sensibile e specifico, meno laborioso della virus-neutralizzazione e, rispetto a quest'ultimo, in grado di rilevare più precocemente la positività sierologica (1). Trattandosi di un test quantitativo è necessario stabilire un valore-soglia per l'interpretazione dei risultati. Si tratta di una scelta difficile in quanto legata ai fattori sopracitati. Per questo motivo sono stati presi in considerazione soprattutto gruppi non vaccinati e allevamenti trattati solo con vaccini vivi attenuati appartenenti al sierotipo M41. Inoltre, riteniamo che il limite da noi adottato

($\geq 1/512$) offra sufficienti garanzie di specificità, confortati da quanto riportato in letteratura (3).

I dati sierologici raccolti, a cui vanno aggiunti gli isolamenti di ceppi di campo di IBV (alcuni tipizzati e altri in corso di tipizzazione) dimostrano l'ampia diffusione del sierotipo 793B nelle principali regioni a vocazione avicola del nostro paese.

Bibliografia

1. Cavanagh D., Naqi S.A. (1997) "Infectious Bronchitis". In: Calnek B.W.: Diseases of Poultry 10th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa 511-526.
2. Cook J.K.A., Orbell S.J., Woods M.A., Huggins M.B. (1996) "A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B)". The Veterinary Record, 138, 178-180.
3. De Wit J.J., Mekkes D.R., Kouwenhoven B., Verheijden J.H.M. (1997) "Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers". Avian Pathology, 26, 195-118.
4. De Wit J.J. (2000) "Detection of infectious bronchitis: a technical review". Avian Pathology, 29, 71-93.

Tabella 1: Sierodiagnosi di IBV nel periodo Giugno 1999 – Dicembre 1999 (totale campioni: 2639)

Table 1: Serodiagnosis of IBV in the period June 1999 – December 1999 (2639 samples tested)

Provenienza	Gruppi esaminati
Piemonte	37
Lombardia	11
Veneto	4
Emilia Romagna	88
Marche	16
Altre	2
Totale	158

Tabella 2: Risultati della sierodiagnosi di IBV nel periodo Giugno 1999 – Dicembre 1999

Table 2: Serodiagnosis of IBV in the period June 1999 – December 1999: results

Sierotipo	793B	M41	dubbio
n.allevamenti	100	45	13
% positivi	63,3%	28,5%	8,3%

Tabella 3: Sierodiagnosi di IBV nel periodo Marzo 2000– Giugno 2000 (totale campioni: 2639)

Table 3: Serodiagnosis of IBV in the period March 2000 – June 2000 (1177 samples tested)

Provenienza	Gruppi esaminati
Piemonte	19
Lombardia	4
Veneto	5
Emilia Romagna	38
Marche	2
Altre	3
Totale	71

Tabella 4: Risultati della sierodiagnosi di IBV nel periodo Marzo 2000 – Giugno 2000

Table 4: Serodiagnosis of IBV in the period March 2000 – June 2000: results

Sierotipo	793B	M41	dubbio
n.allevamenti	39	27	5
% positivi	54,9%	38%	7%

Tabella 5: Riepilogo risultati della sierodiagnosi di IBV nel periodo Giugno 1999– Giugno 2000

Table 5: Serodiagnosis of IBV in the period June 1999 – June 2000: total results

Totale diagnosi di IBV	229 (100%)
Positivi 793B	139 (60,6%)
Positivi M41	72 (31,4%)
Positivi IBV (sierotipo dubbio)	18 (07,8%)

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA *IN VITRO* DI
ANTEC VIRKON S®, ANTEC FARM FLUID S® E ANTEC AMBICIDE®
NEI CONFRONTI DI ALCUNI CEPI BATTERICI DI ORIGINE AVIARE**

L. Fiorentini¹, G. Tosi¹, P. Massi¹, M.A. Beghian², S. Zamboni³

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì

²Antec international ltd. ³Nuove tecnologie

Parole chiave: disinfettanti chimici, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, efficacia *in vitro*

In vitro efficacy of Antec Virkon S®, Antec Farm Fluid S® and Antec Ambicide® on some avian bacterial strains

Key words: chemical disinfectants, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, in vitro efficacy

Summary: In vitro efficacy of three formulated disinfectants against some bacterial pathogenic strains isolated in poultry farms was evaluated. The study was conducted in distilled water only and in presence of hard water and organic material. Following the manufacturer's recommendations, all products assessed were able to eliminate the tested strains also in presence of hard water and organic matter.

Correspondence: Fiorentini L. – Borsista presso Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1, 47100 Forlì – Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Le procedure di biosicurezza comprendono tutte le misure preventive di natura gestionale ed igienico-sanitaria da adottare per prevenire l'introduzione e la circolazione di agenti patogeni in allevamento (3). Una delle principali componenti della biosicurezza è l'applicazione di piani di pulizia e disinfezione di ambienti, attrezzature, mezzi di trasporto, equipaggiamenti del personale (1). Un buon disinfettante deve essere in grado di agire in presenza di materiale organico (difficile da rimuovere completamente con le operazioni di lavaggio) e di acque "dure" (tipiche del nostro territorio) (2). Il presente studio ha lo scopo di valutare l'efficacia *in vitro* di tre disinfettanti chimici nei confronti di alcuni ceppi batterici tra i più diffusi e patogeni in campo avicolo. Le prove sono state eseguite sia in condizioni ideali per l'azione dei disinfettanti, sia in condizioni reali di campo per la presenza di sostanza organica e di acqua dura.

Materiali e metodi

Ceppi batterici: sono stati impiegati i seguenti ceppi batterici: 1) *Salmonella enteritidis*, isolato in un gruppo di pulcini in corso di malattia caratterizzata da mortalità e lesioni tipiche della forma setticemica. 2) *Escherichia coli*, isolato da un gruppo di broilers colpito da una sindrome respiratoria da virus della bronchite infettiva complicata, appunto, da una forma setticemica da E.coli. 3) *Staphylococcus aureus*, isolato da un gruppo di pollastre colpite da artrosinovite tibiotarsica.

Le colture batteriche sono state preparate in brodo BHI e sottoposte a conteggio in piastra su Agar Triptosio. Le brodocolture sono state in seguito diluite in acqua distillata fino a raggiungere la concentrazione finale di 500X10⁶ cfu/ml. Limitatamente al presidio Antec Virkon S è stata eseguita una prova supplementare impiegando 500 X10⁹ cfu/ml.

Disinfettanti: le principali caratteristiche dei disinfettanti impiegati sono riportate in tabella 1.

Prova di efficacia: le diluizioni dei disinfettanti sono state eseguite in acqua distillata fino a 10 volte la concentrazione finale richiesta. Per la prova in condizioni "sterili", 2ml di ogni soluzione disinfettante

sono stati aggiunti a 16 ml di acqua distillata sterile e a 2ml di brodocoltura in modo da ottenere la concentrazione finale richiesta (1:100 e 1:1000 per E.coli e S.enteritidis; 1:50 e 1:500 per S.aureus). Ad intervalli di 5, 15 e 30 minuti, 0,1ml di soluzione è stata prelevata e messa a contatto con 0,9 ml di soluzione "neutralizzante" (formata da sodio tiosolfato, Tween 80, L-istidina e lecitina); 0,02 ml di quest'ultima soluzione è stata distribuita su piastre di Agar Hektoen e Agar sangue (per S.aureus), incubate poi a 37°C. Dopo 24 ore di incubazione è stata eseguita la lettura delle colonie batteriche eventualmente sviluppatesi. Per la prova in presenza di acqua dura e materiale organico, la soluzione disinfettante è stata diluita con una soluzione formata da 4 ml di acqua distillata sterile e 12 ml di una sospensione al 5% di lievito in acqua dura (0,304 gr di CaCl₂ e 0,139 gr. di MgCl₂ in 1 litro di acqua distillata). Prima dell'aggiunta della brodocoltura, le due soluzioni sono state miscelate tra loro per 45 minuti.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 2-5.

Discussione

I tests confermano l'efficacia *in vitro* dei tre presidi alle diluizioni d'uso consigliate dalla ditta produttrice. Soprattutto per Antec Virkon S® e Antec Farm Fluid S® destano interesse anche i risultati ottenuti a diluizioni superiori. Trattandosi di dati preliminari e non di veri e propri tests quantitativi è azzardato prevedere un loro impiego in campo a tali concentrazioni (1:500 o 1:1000). Positiva è inoltre l'azione di Antec Virkon S® nei confronti di *S.enteritidis* ed *E.coli* in presenza di concentrazioni batteriche estremamente elevate (Tabella 5). Le prove confermano l'efficacia dei tre composti in presenza di acqua dura e di materiale organico. E' da sottolineare inoltre, la loro rapidità d'azione, evidente dopo soli 5 minuti di contatto con le colture batteriche.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il sig. Silvano Bussi, tecnico di laboratorio della Sezione IZSLER di Forlì.

Bibliografia

1. Jeffrey J.S. (1997) "Biosecurity rules for poultry flocks". World Poultry, Misset volume 13, 101.

2. Russel A.D., Hugo H.B. (1987) "Chemical disinfection" in: Linton A.H.: Disinfection in veterinary and farm practice, Blackwell Scientific Publication – UK, 12-42.
3. Shane S. (1995) "Decontamination of housing and equipment" in: American Association of Avian Pathologists: Biosecurity in the poultry industry. University of Pennsylvania, New Bolton Center 35-41.

Tabella 1: Principali caratteristiche dei disinfettanti impiegati

Table 1: Characteristics of disinfectants used

Nome commerciale	Composizione	Diluizioni d'uso*
Antec Virkon S®	Formulazione multiattiva stabilizzata a base di perossidi, tensioattivi, catalizzatori inorganici e sostanze ad azione tampone	Da 1:100 a 1:200
Antec Farm Fluid S®	Miscela di derivati acidi del catrame distillati ad alto punto di ebollizione, acidi organici e tensioattivi	Da 1:100 a 1:200
Antec Ambicide®	Miscela di derivati terziari alchil-amminici, sali quaternari d'ammonio a doppia catena, sinergizzanti ad azione schiumogena	Da 1:50 a 1:200

*Raccomandate dalla ditta produttrice in funzione del tipo di disinfezione.

Tabella 2: Efficacia in vitro di Antec Virkon S®

Table 2: In vitro efficacy of Antec Virkon S®

Temp °	<i>S.enteritidis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica
5 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
15 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:150) 0 (1:500)

°n. di colonie batteriche sviluppate e, tra parentesi, diluizione del disinfettante

Tabella 3: Efficacia in vitro di Antec Farm Fluid S®

Table 3: In vitro efficacy of Antec Farm Fluid S®

Temp °	<i>S.enteritidis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica
5 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
15 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)

Tabella 4: Efficacia in vitro di Antec Ambicide®

Table 4: In vitro efficacy of Antec Ambicide®

Temp °	<i>S.enteritidis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica
5 min	0 (1:100) 59 (1:1000)	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 1 (1:1000)	0 (1:100) 17 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
15 min	0 (1:100) 14 (1:1000)	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 1 (1:1000)	0 (1:100) 13 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 1 (1:1000)	0 (1:100) 13 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)

Tabella 5: Efficacia in vitro di Antec Virkon S® in presenza di 500X10⁹ cfu/ml

Table 5: In vitro efficacy of Antec Virkon S® using 500X10⁹ cfu/ml

Tem po	<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica
5 min	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 46 (1:1000)	0 (1:100) 5 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)
15 min	0 (1:100) 9 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)

COMUNICAZIONE 17

METODICA ELISA PER L'EVIDENZIAMENTO DI ANTICORPI ANTI-INFLUENZA H7 IN SIERI SPERIMENTALI E DI CAMPO

P. Cordioli, G. Sala, A. Moreno-Martin, A. Lavazza, S. Rigola, S. Grazioli, E. Brocchi

Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Brescia

Parole chiave: ELISA, anticorpo monoclonale anti-H7, sierologia

ELISA Test for detection of influenza H7 antibodies in experimental and field sera

Key words: ELISA, Anti H7 monoclonal antibody, serology

Summary: Using a MAb specific for the H7 of the 2676 LPAI an ELISA test has been developed; the test is able to assess specific H7 antibodies in avian sera. The H7 ELISA has shown a 99% concordance of results with the classical HI test.

Correspondence: P. Cordioli, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" – Via A. Bianchi 9, 25124 Brescia - diagnvir@bs.izs.it

Introduzione

La recente epizoozia di Influenza da ceppi H7N1 ha determinato un consistente aumento di indagini virologiche e sierologiche. Si è di conseguenza evidenziata la necessità di avere a disposizione un'altra metodica sierologica da utilizzare parallelamente alla inibizione della emoagglutinazione, metodo normato descritto nel D.P.R. 656/96, per controllare sieri dubbi, emolitici o per evidenziare anticorpi nel tuorlo (materiale che prevede diluizioni maggiori per essere utilizzato in inibizione della emoagglutinazione)

Materiali e metodi

Virus: per la produzione di anticorpi monoclonali è stato utilizzato il ceppo di influenza H7N1 (2676) isolato nel marzo 1999 da un allevamento di tacchini da carne della Provincia di Verona e caratterizzato come ceppo a bassa virulenza dal Centro Europeo per i virus influenzali di Weybridge.

Anticorpi Monoclonali: il liquido allantoideo prelevato tra la 48^a e la 72^a ora dall'inoculazione è stato ultracentrifugato su cuscinio di saccarosio e inoculato in topi balb/c previa emulsione con adiuvante di Freund completo. Dopo un richiamo con Freund incompleto 4 settimane dopo il primo inoculo, gli animali sono stati richiamati con antigene non adiuvato per via intraperitoneale tre giorni prima della fusione degli splenociti con cellule NS0 secondo metodica standardizzata. Lo screening degli ibridomi è stato eseguito in ELISA su antigene H7N1, H3N2, Virus della Bronchite Infettiva ceppo Mass 41 e liquido allantoideo prelevato da uova SPF non inoculate. La specificità degli anticorpi è stata inoltre valutata in prove di competizione con sieri sperimentali di pollo monospecifici per H7, H5, H9, H6.

Sieri sperimentali: mediante infezioni sperimentali in animali SPF di età variabile dai 20 giorni ai 6 mesi sono stati prodotti sieri iperimmuni specifici per H7, H5, H6, H9. Per ciascun sierogruppo sono stati usati 8 animali SPF inoculati per via endovenosa con 0,5 ml di liquido allantoideo e richiamati con il doppio della dose per via intramuscolare 25 giorni dopo. Il salasso in bianco è stato effettuato circa 15 giorni dopo secondo richiamo.

Animali SPF di 20 giorni sono stati vaccinati con vaccino sperimentale H7N1; 4, 6 e 8 settimane dopo un'unica somministrazione di vaccino sono stati salassati e sottoposti a challenge per via intratracheale con ceppo omologo ad alta patogenicità (ceppo 13474). Dopo due settimane gli animali sono stati di nuovo salassati. In totale per la prova di vaccinazione sono stati utilizzati 100 animali SPF ed esaminati 248 sieri.

Sieri di campo: per la validazione del test sono stati utilizzati 820 sieri esaminati per la routine diagnostica dell'influenza aviaria presso il Laboratorio Virologia Specializzata dell'IZSLER. Tra questi vi erano anche 27 sieri di galline ovaiole sieropositive per infezione naturale con ceppi a bassa virulenza e, inoltre, 20 campioni di tuorlo proveniente dallo stesso allevamento.

Test ELISA specifico per anticorpi H7: piastre per ELISA Nunc maxisorp vengono adsorbite con antigene H7N1 parzialmente purificato alla diluizione d'uso in carbonato-bicarbonato pH 9,6 per una notte a 4°C. I sieri vengono esaminati in due diluizioni 1/5 e 1/10, aggiungendo in ogni piastra i sieri di controllo positivo e negativo e prevedendo dei pozzetti di reazione 100% in cui non viene aggiunto alcun siero; contemporaneamente ai sieri in esame viene aggiunto il monoclonale 3G1 opportunamente diluito. Dopo 1

ora di incubazione le piastre vengono lavate e viene aggiunto un siero anti-IgG di topo coniugato con perossidasi. Al termine di un'altra ora di incubazione viene aggiunto il substrato cromogeno OPD e la lettura viene effettuata tramite spettrofotometro con filtro a 492 nm. Un siero è considerato positivo se inibisce più del 50% il valore di densità ottica dei pozzetti di controllo della reazione.

Test ELISA per anticorpi anti-Nucleoproteina tipo A: per tale test si è utilizzato l'anticorpo monoclonale ATCC N°: HB 65, H16-L10-4R5 e la metodica descritta da de Boer *et al.* (1990)

Risultati

Anticorpi Monoclonali: con un unico procedimento di fusione sono stati prodotti due ibridomi specifici per il virus H7N1, denominati 2G1 e 3G1. Nessuno dei MAb mantiene la reattività in Western Blotting ma tramite prove di competizione con sieri H7, H5, H6, H9 si è verificato che mentre il MAb 2G1 riconosce tutti i virus esaminati, il MAb 3G1 viene inibito al legame all'antigene solo dal siero H7N1 risultando perciò specifico per tale ceppo. La reattività del MAb 3G1 è probabilmente diretta nei confronti della emoagglutinina H7, in quanto anche sieri immuni nei confronti di H7N3 (gentilmente forniti dalla Dr. I.Capua del Centro di Referenza Nazionale dell'Influenza aviare, IZS delle Venezie) inibiscono il suo legame all'antigene.

Sierologia: i risultati delle indagini effettuate in parallelo con l'ELISA H7 e l'inibizione dell'emoagglutinazione hanno portato ad una perfetta concordanza dei risultati tra le due metodiche come dimostrato in tabella 1.

I 7 sieri positivi all'HI e negativi in ELISA erano campioni che presentavano valori soglia in HI (1/16 - 1/32) e mantenevano il titolo anche dopo inattivazione. Tali sieri provenivano da 5 diversi allevamenti (2 di galline ovaiole e 3 di tacchini da carne) che sottoposti ad ulteriori campionamenti sono risultati sempre negativi. Gli stessi sieri, esaminati con il test ELISA npA sono risultati costantemente negativi.

Conclusioni

Pur esaminando un numero limitato di sieri la metodica ELISA H7 si è dimostrata altamente specifica e molto versatile anche con campioni di tuorlo, dimostrando i vantaggi tipici di una reazione immunoenzimatica:

- 1) Utilizzo di reagenti standardizzabili;
- 2) Automatizzazione e oggettività della lettura;
- 3) Possibilità di esaminare i sieri in un'unica diluizione;
- 4) Non necessitano trattamenti preliminari dei sieri, quali inattivazione o trattamento con globuli.

E' necessario comunque verificare su un numero ben più elevato di sieri e tuorli la rispondenza dei risultati con il test ufficiale e verificare la possibilità di coniugare direttamente il MAb 3G1 in modo da portare ad una sola ora i tempi necessari per l'esecuzione del test.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa e costruttiva collaborazione la Dr.ssa D.Gamba e le Sig.re Daniela Bresciani, Francesca Adella e Sara Verzeletti

Bibliografia

- 1) de Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D.M.E. (1990) "An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species". Arch. Virol., 115, 47-61

Tabella 1: Confronto dei risultati ottenuti in Inibizione dell'emoagglutinazione ed ELISA

Table 1: Comparison of the results obtained with haemoagglutination inhibition test and ELISA

		Inibizione della Emoagglutinazione	
		+	-
ELISA	+	195	0
	-	7	866

INDIVIDUAZIONE DELLA NUCLEOPROTEINA DEL VIRUS INFLUENZALE TIPO A IN CAMPIONI PATOLOGICI AVIARI CON TECNICA ELISA-SANDWICH

A. Moreno-Martin, P. Cordioli, G. Sala, S. Rigola, A. Lavazza
Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertyni" - Brescia

Parole chiave: influenza A, ELISA, ricerca antigene

ELISA test for Influenza A viral nucleoprotein detection in avian pathological samples

Keywords: influenza, ELISA, antigen detection

Summary: A sandwich enzyme-linked immunoadsorbent assay was developed to detect influenza A viral antigen, using a monoclonal antibody (Mab) directed against type-specific influenza A nucleoprotein. MAb anti-NP was used to coat ELISA plates as well as to prepare the peroxidase conjugate. Viral nucleoprotein was detected from organs homogenates of avian origin. This test is rapid and easy to perform but does not permit influenza A subtyping. Anyway the official test of viral isolation was performed in all the samples.

Correspondence: P.Cordioli, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertyni" – Via Bianchi 9 25124 Brescia - diagnvir@bs.izs.it

Introduzione

Durante l'epidemia di influenza aviaria che ha interessato le regioni del nord Italia negli anni 1999 e 2000, sostenuta da un virus tipo A H7N1, si è evidenziata la necessità di disporre di metodiche diagnostiche rapide per una prima identificazione virale. La metodica diagnostica ufficiale di isolamento ed identificazione virale, che richiede tempi di risposta più lunghi, si basa sull'impiego di uova embrionate di pollo SPF (UEP) spesso di limitata disponibilità per i laboratori. Tuttavia, essa consente l'identificazione del sottotipo virale.

D'altra parte, da tempo è possibile utilizzare una tecnica Double Antibody Sandwich ELISA, con anticorpi monoclonali, per rilevare la presenza della nucleoproteina del virus influenzale tipo A nel liquido allantoideo di uova embrionate inoculate con materiale derivato da diverse specie animali (suino, equino, aviare), uomo compreso. Notoriamente questa tecnica assicura elevata sensibilità e specificità e presenta una relativa semplicità di esecuzione; non consente però di giungere alla diagnosi di sottotipo per la quale si deve ricorrere all'inibizione dell'emoagglutinazione con gli antisieri corrispondenti.

Al fine di ridurre i tempi di risposta si è testato il metodo ELISA, anche a partire direttamente da campioni di visceri di volatili di diverse specie con sintomatologia clinica o comunque sospetti di infezione influenzale.

E' comunque da sottolineare che gli esiti analitici al fine di una diagnosi di certezza, richiedono comunque la conferma tramite le metodiche ufficiali di isolamento ed identificazione virale.

Materiali e metodi

Anticorpo monoclonale: è stato utilizzato un anticorpo monoclonale nei confronti della nucleoproteina A del virus influenzale. Tale anticorpo è stato standardizzato da Yewdell *et al.* (1981) ed è distribuito dalla American Type Culture Collection (ATCC n. HB65, H16-L 10-4R5).

Campioni: la ricerca è stata condotta su estratti di polmone, trachea e tonsille ciecali ottenuti da 210 volatili di specie diverse (pollo 116, tacchino 73, altre 21), conferiti nell'ambito dei controlli eseguiti nel corso dell'epidemia influenzale 1999-2000 in Lombardia. La maggior parte degli animali esaminati presentava

sintomatologia clinica. I campioni, sospesi in Minimal Essential Medium 1/10 (MEM) antibiotato, sono stati utilizzati tal quale e diluiti 1:2 nel test ELISA e successivamente sono stati inoculati in UEP per l'isolamento e identificazione virale.

ELISA: la metodica eseguita è quella descritta da Siebinga e de Boer (1988). Brevemente, le micropiastre di polystirene vengono adsorbite una notte a 4°C con 50 µl della diluizione ottimale del MAb HB65 in tampone sodio carbonato (pH 9,6). Prima dell'uso si eseguono tre lavaggi delle piastre con tampone di lavaggio (PBS A con 0,5% Tween 20). Le diluizioni vengono fatte utilizzando tampone di lavaggio con 1% di lievito e 1% di siero di topo. Vengono quindi aggiunti in due repliche 50 µl di ogni campione sospeso 1:10 in MEM antibiotato e successivamente diluiti 1:2, e quindi il controllo positivo (liquido allantoideo di UEP inoculate con il ceppo A/tacchino/Italia/2676/1999) ed il negativo (liquido allantoideo di UEP SPF). Dopo incubazione per 60 minuti a 37°C e lavaggio, si aggiungono 50µl del MAb HB65 coniugato con perossidasi alla concentrazione d'uso e si incuba per altri 60 minuti a 37°C. Dopo un ulteriore lavaggio, si aggiunge il substrato cromogeno (OPD) attivato con H₂O₂ che viene bloccato dopo 10 minuti con 50 µl di H₂SO₄ 2M. La lettura viene fatta con uno spettrofotometro a 492 nm. Si considerano positivi i campioni che presentano un valore di densità ottica superiore a 0.250

Isolamento ed identificazione virale: Gli estratti, previamente filtrati (0,45 µm), sono stati inoculati in uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni. Il liquido allantoideo raccolto dagli embrioni morti è stato quindi sottoposto alle prove di emoagglutinazione ed inibizione della emoagglutinazione con l'antisiero H7. Il medesimo liquido allantoideo è stato saggiato anche con ELISA secondo la procedura sopra descritta per una prova comparativa.

Risultati e Discussione

Dei 210 campioni analizzati, 189 hanno fornito esito positivo con la metodica ufficiale di isolamento ed identificazione del virus influenzale. Sui campioni positivi, il test ELISA per la ricerca della nucleoproteina a partire dagli estratti d'organo, ha confermato la positività in soli 105 casi.

Complessivamente gli esiti ottenuti indicano che la tecnica ELISA presenta una specificità elevata e dello stesso ordine della metodica ufficiale di isolamento ed identificazione virale. A conferma di ciò è da rilevare che tutti i campioni ottenuti da volatili risultati negativi alla metodica ufficiale, e quindi "non infetti", sono risultati negativi, presentando valori di densità ottica nettamente inferiori al valore soglia di 0.250. Il limitato numero di questi campioni (collegabile al fatto che, nel periodo citato, la stragrande maggioranza dei campioni conferiti al laboratorio risultava positivo al virus influenzale), rende questo risultato, seppur significativo, meritevole di ulteriori conferme.

Dalle stesse prove si ottiene una sensibilità complessiva del test ELISA da estratti d'organo pari al 55,5%; valore relativamente limitato se valutato in senso assoluto, ma comunque interessante se valutato entro i limiti di una prima, e rapida, valutazione nel caso di conferimenti composti da elevati numeri di campioni in periodi di emergenza o da aree territoriali sospette.

Il livello di sensibilità ottenuto è attribuibile a limitate cariche virali nei visceri. A conferma di ciò è da sottolineare che, dopo il passaggio del materiale su UEP per incrementare il titolo virale, si è potuta evidenziare la positività di tutti i campioni di liquido allantoideo sottoposti alla medesima metodica analitica.

Conclusioni

Tabella 1: confronto dei risultati ottenuti con i tests utilizzati

Table 1: Comparison of the results obtained with the test used

	Numero campioni	Positivi		Negativi	
Metodica Ufficiale	210	189		21	
ELISA su LA	210	189		21	
ELISA su EO	210	+ 105	- 84	+ 0	- 21

LA: liquido allantoideo; EO: estratti d'organo

Il test ELISA risulta di facile e rapida esecuzione e soprattutto, quando eseguito sugli estratti di visceri, permette di ottenere esiti in tempi ridotti (fino a poche ore).

Tale aspetto, insieme alla ottimale specificità ottenuta, rende il test particolarmente adatto a far fronte alle particolari esigenze che si vengono a creare quando ci si trovi ad operare in condizioni particolari quali quelle verificatesi nelle regioni del Nord Italia nel periodo di massima diffusione dell'epidemia influenzale.

La possibilità di eseguire un elevato numero di analisi, con tempi di risposta brevi e di affermare con relativa certezza che i campioni positivi corrispondono effettivamente a campioni infetti, ha consentito, infatti, di fornire indicazioni utili agli operatori del Servizio Sanitario sul territorio.

E' tuttavia evidente che, anche in considerazione della sensibilità limitata del ELISA, gli esiti definitivi devono essere forniti soltanto attraverso la metodica ufficiale.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa e costruttiva collaborazione le Sig.re Daniela Bresciani, Francesca Adella e Sara Verzeletti

Bibliografia

- 1) Siebinga J.T., de Boer G.F. (1988) "Influenza A viral nucleoprotein detection in isolates from human and various animal species" Archives of Virology 100: 75-87.
- 2) Yewdell J.W., Frank E., Gerhard W. (1981) "Expression of influenza virus internal antigens on the surface of infected P815 cells" J Immunology 126: 1814-1819