



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

**CAMERA DI
COMMERCIO
INDUSTRIA
ARTIGIANATO E
AGRICOLTURA DI
FORLÌ-CESENA**



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

***“Indagini epidemiologiche e
controllo delle malattie
infettive nell’allevamento
avicolo”***

Relazioni e Comunicazioni

**Forlì,
4-5 ottobre 2001**

Relazioni

	Pag.
1) <i>G. F. Greppi, P. Roncada, M. Tranquillo</i> L'EPIDEMIOLOGIA STRUMENTO DI SUPPORTO PER L'ANALISI INTELLIGENTE DEI DATI	3
2) <i>M. Folden Flensburg</i> FATTORI DI RISCHIO ASSOCIATI CON I FOCOLAI DI MALATTIA DI GUMBORO IN FORMA CLINICA ACUTA. NEI GRUPPI DI BROILER IN DANIMARCA NEL 1998 E 1999	15
3) <i>S. Marangon, M. Bettio, L. Bortolotti, N. Ferrè, C. Terregino, M. Dalla Pozza</i> INFLUENZA AVIARE (H7N1) IN ITALIA: SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA E STRATEGIE DI CONTROLLO	18
4) <i>J.P. Vaillancourt, H.J. Barnes</i> L'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN CORSO DI MALATTIE EMERGENTI DI ORIGINE SCONOSCIUTA: L'INSEGNAMENTO TRATTO DALL'EPIDEMIA DI POULT ENTERITIS MORTALITY SYNDROME (PEMS) DEL TACCHINO IN NORTH CAROLINA	24

RELAZIONE 1**L'EPIDEMIOLOGIA STRUMENTO DI SUPPORTO PER L'ANALISI INTELLIGENTE DEI DATI****G. F. Greppi¹, P. Roncada¹, M. Tranquillo²**¹Istituto di Medicina Legale e Legislazione Veterinaria. Laboratorio di Bioinformatica e Statistica Applicata. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Milano.²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regionale della Lombardia- Brescia

Parole chiave: epidemiologia, analisi dei dati, misure statistiche

The epidemiology as supporting tool for a clever analysis of data

Key words: epidemiology, data analysis, statistical measures

Correspondence: Gian Franco Greppi -Istituto di Medicina Legale e Legislazione Veterinaria. Laboratorio di Bioinformatica e Statistica Applicata. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Milano. Via Celoria 10, 20133 Milano. Email: greps@mailserver.unimi.it

INTRODUZIONE

I primi concetti di epidemiologia (dal greco epidemiologia=studio della popolazione) si ritrovano negli scritti di Ippocrate che osserva come alcune patologie umane siano correlate a condizioni ambientali e individuali. Per i successivi 2000 anni le cause di morte o di malattia, pur sottoposte a innumerevoli osservazioni, non furono mai oggetto di indagini analitiche. Solamente nel 1662, su proposta di re Carlo II, la Società Reale di Londra diede alle stampe il volume "Osservazioni naturali e politiche elencate nell'indice seguente ed eseguite sui bollettini della mortalità, dal Capitano Luigi Graunt socio della Società Reale, con riguardo al governo, alla religione, al commercio allo sviluppo, al clima, alle malattie ed ai vari mutamenti della città". In questa opera si considera per la prima volta la morte non come evento individuale, ma come studio collettivo. Nel 1687 Edmondo Halley costruisce la prima tabella concernente l'esperienza di vita della popolazione della città di Breslau, tabella molto simile a quella in uso attualmente negli studi demografici. Due secoli più tardi William Farr elabora un sistema di raccolta dei certificati di morte ed imponendo la segnalazione della causa di morte accanto ai dati anagrafici. L'epidemiologia moderna nasce in Inghilterra tra il 1848 e il 1853 durante le epidemie di colera che colpirono la città di Londra. Un medico, il Dr. John Snow, attraverso le osservazioni cliniche arrivò ad ipotizzare che l'acqua contaminata dai reflui cittadini potesse essere il veicolo del contagio. Per dimostrare questa teoria, in collaborazione con il Dr. Farr analizzò i certificati di morte per colera degli abitanti di un distretto londinese in cui veniva fornita acqua da due compagnie idriche differenti: la Lambeth che si approvvigionava di acqua del Tamigi presa prima dell'entrata del fiume in città, e quindi verosimilmente non inquinata, e la Southwark-Vauxhall C. che invece forniva acqua presa a valle del Tamigi e quindi fortemente inquinata. Analizzando i tassi di mortalità scopri che nei quartieri forniti dalla Southwark-Vauxhall C il tasso di mortalità specifico per colera era 5,35 volte superiore a quello dei quartieri forniti dalla Lambeth. Forte di queste evidenze John Snow convinse le autorità a chiudere la famosa Broad Street pump, ponendo fine alla diffusione della malattia. Circa trent'anni dopo gli Studi di John Snow, Robert Kock identificò il *Vibrio Cholerae*, come agente eziologico del colera.

Gli studi epidemiologici riprendono nel primo novecento, è infatti del 1923 l'articolo di Greenwood che nell'ambito dello studio naturale del cancro, fornisce la formula per il calcolo dell'errore standard della probabilità di sopravvivenza, stimato sulla base campionaria. È nel corso del secondo conflitto Mondiale, che progrediscono gli studi e i metodi atti a valutare la affidabilità delle apparecchiature militari ed in particolare la durata di "VITA" delle loro componenti. Avvalendosi delle conoscenze tecniche i ricercatori sono portati a formulare ipotesi sulla funzione di densità di probabilità dell'evento studiato. Pertanto essi pongono particolare enfasi sulla formulazione di modelli parametrici (esponenziale, log-normale, Weibull). Negli ultimi vent'anni si è osservato un massiccio utilizzo dei metodi di analisi della sopravvivenza, nelle sperimentazioni cliniche controllate e nello studio della storia naturale della malattia (Altman 1991). All'inizio del XXI secolo l'epidemiologia può essere considerata come una disciplina autonoma che ha assunto dei connotati definiti nell'ambito della realtà sanitaria nazionale.

L'epidemiologia può essere quindi definita come la disciplina che si occupa dello studio delle malattie e dei fenomeni ad esse correlati attraverso l'osservazione della distribuzione e dell'andamento delle patologie nella popolazione, l'individuazione dei fattori di rischio o dei determinanti di salute/malattia nonché la programmazione degli idonei interventi preventivi attraverso un'adeguata offerta sanitaria. Gli eventi clinici sono quindi la base e l'oggetto dello studio epidemiologico e in particolare soffermiamo il nostro interesse sui metodi di analisi matematica di eventi clinici che hanno effetto sulla salute. La tabella sottostante riporta quelle che nella lingua inglese vengono definite le 5 D (death, disease, disability, discomfort, dissatisfaction).

Effetti	Eventi clinici
Morte (death)	Dal punto di vista clinico è importante la tempestività nella segnalazione.
Malattia (disease)	Una combinazione di sintomi, segni fisici, risultati di laboratorio.
Invalità(disability)	Stato funzionale, incapacità di svolgere attività o movimenti.
Disagio (discomfort)	Sintomi come dolore, nausea
Insoddisfazione (dissatisfaction)	Stati emozionali, in ambito animale possiamo associare le turbe comportamentali.

Possiamo considerare diversi settori di interesse in ambito epidemiologico:

- Epidemiologia descrittiva o di popolazione che studia la distribuzione degli eventi.
- Epidemiologia analitica che studia le cause delle malattie. Gli epidemiologi sono generalmente più interessati a ciò che avviene piuttosto che al modo con cui questo avviene in termini di meccanismi patogenetici.
- Epidemiologia clinica che ha come oggetto lo studio dell'intera popolazione e comprende le metodologie relative alla sperimentazione. In particolare l'epidemiologia clinica consente di effettuare ed interpretare osservazioni scientifiche in medicina. Essa si basa sull'applicazione dei principi e dei metodi epidemiologici per affrontare i problemi della clinica.

Nell'ambito della sanità pubblica l'epidemiologia concorre quindi e in modo sempre più importante a far raggiungere alle popolazioni una condizione ottimale, definita dall'OMS come uno stato di completo benessere fisico, mentale, e sociale e quindi non soltanto di assenza di malattia o infermità. La tabella riporta gli ambiti di interesse di applicazione degli studi epidemiologici (Jekel et al. 1996).

<input type="checkbox"/>	Studio dei fenomeni epidemici.
<input type="checkbox"/>	Ricostruzione della storia naturale della malattia.
<input type="checkbox"/>	Identificazione dei fattori di rischio.
<input type="checkbox"/>	Quantificare le inter-relazioni tra salute e malattia.
<input type="checkbox"/>	Valutazione degli interventi sanitari preventivi.
<input type="checkbox"/>	Definizione delle priorità in sanità pubblica.
<input type="checkbox"/>	Definizione dei parametri per la valutazione dell'efficacia, efficienza e qualità dei servizi sanitari.
<input type="checkbox"/>	Valutazione tecniche per la soluzione dei problemi legali.
<input type="checkbox"/>	Valutazioni in farmacovigilanza.
<input type="checkbox"/>	Sorveglianza epidemiologica di resistenza.

Per quanto attiene alla farmacovigilanza dagli anni '60 ad oggi sono stati ritirati dal mercato oltre 120 prodotti, alcuni dei quali sono riportati nella seguente tabella.

Motivo del ritiro dei farmaci (1960-2001)		Principali farmaci ritirati dal mercato	
Epatossicità	26.0 %	1997	Troglitazone (ipoglicemizzante)
Emotossicità	10.5 %	1998	Tolcapone (anti-parkinson)
Cardiotossicità	8.7 %	1999	Trovaflaxacine (antibiotico)
Reazioni cutanee	6.3 %	2001	Lipobay (ipocolesterolemizzante)

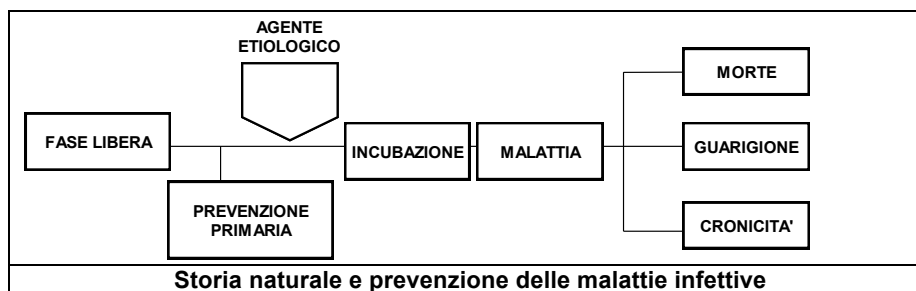
Studi epidemiologici

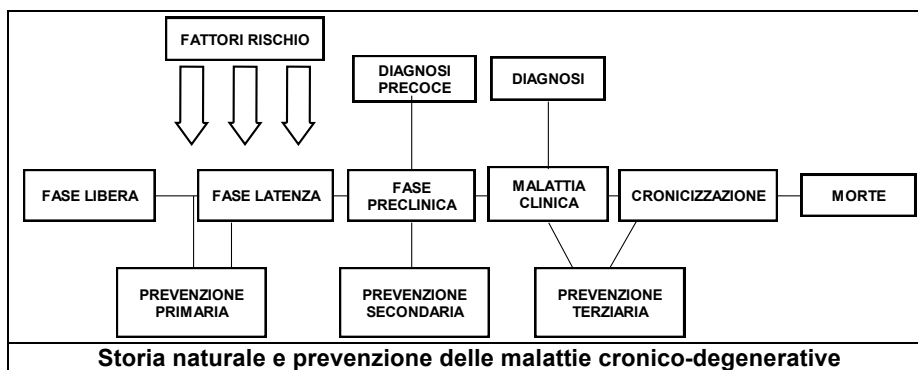
La metodologia epidemiologica prevede l'acquisizione delle informazioni sulla frequenza delle malattie e sui fattori di rischio, attraverso l'implementazione di diverse tipologie di studio, che si differenziano tra loro per gli obiettivi che perseguono e le tecniche che applicano. Si distinguono in Studi Osservazionali e in Studi d'Intervento o Clinici (Clinical-Field trial). Negli studi epidemiologici di osservazione la divisione dei soggetti in gruppi, si decide in base alla presenza o all'assenza del fattore di rischio che si vuole testare. Nei trial clinici randomizzati, che sono studi prospettici di intervento, è al contrario lo sperimentatore a stabilire secondo un criterio casuale o random a quale paziente somministrare un farmaco e a quale un placebo (o un altro farmaco di controllo) registrando l'esito nei pazienti che hanno assunto il farmaco e in quelli che hanno assunto il placebo (Signorelli 2000).

Gli Studi Osservazionali vengono classificati in studi prospettici o retrospettivi a seconda di come si colloca nel tempo l'osservazione del fenomeno oggetto dello studio.

Negli Studi Prospettici due coorti di pazienti vengono seguite nel tempo (gli epidemiologi preferiscono usare il termine "sorvegliare" per sottolineare il fatto che il ricercatore non interviene sui fenomeni ma si limita solo a registrarli) per verificare se un determinato evento si verifica o non si verifica.

A differenza degli studi prospettici (un classico esempio è quello riportato da Doll e Peto nel 1994 dove sono stati seguiti per 40 anni 40.000 medici inglesi dal 1951), negli studi retrospettivi i pazienti sono classificati in base all'esito (vivo/morto, affetto/non affetto) invece che per l'esposizione ai fattori di rischio (esempio lo studio francese sulla mortalità dei minatori che hanno lavorato in miniere di uranio in funzione della loro esposizione al radon di Hill, 2000).





Gli studi retrospettivi si effettuano in genere quando la probabilità di sviluppare la malattia è bassa (malattie rare) o quando l'intervallo che separa l'esposizione al fattore di rischio dall'esordio clinico della malattia è molto lungo (malattie a lunga incubazione). Gli Studi di Sopravvivenza sono un particolare tipo di studio epidemiologico che può essere sia di tipo prospettico o retrospettivo. Un esempio di analisi di sopravvivenza di tipo prospettico sono quelli classici applicati nello studio dei tumori, in cui coorti di soggetti affetti da neoplasia sono seguiti per un periodo di tempo fino alla loro morte, con l'obiettivo di stimare la Probabilità di sopravvivenza del singolo soggetto.

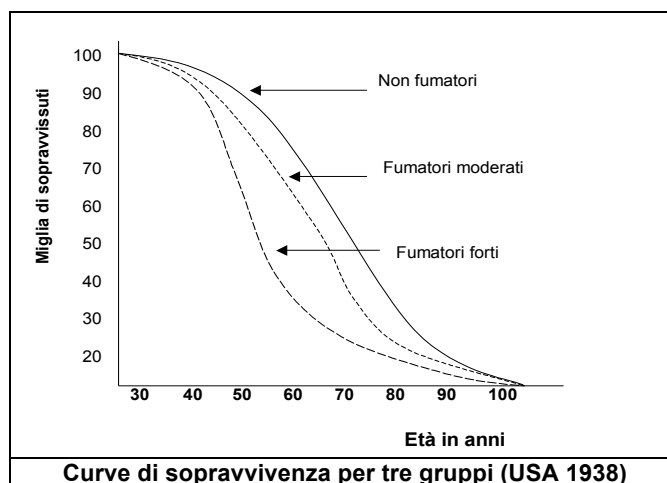
Tipo	Passato	Presente	Futuro
Caso-Controllo	Ricostruzione dell'esposizione	Selezione dei casi e del controllo	
Coorte Prospettica		Scelta della Coorte	Controllo della Coorte
Coorte Storica	Scelta delle Coorte	Ricostruzione	

Un esempio di analisi di sopravvivenza di tipo retrospettivo in Medicina Veterinaria è data dal recente studio di Benard et al. (1997), in cui sono stati analizzati i fattori associati alla funzione di probabilità di "sopravvivenza" degli allevamenti di suini durante l'epidemia di Peste suina classica verificatasi in Olanda nel 1999.

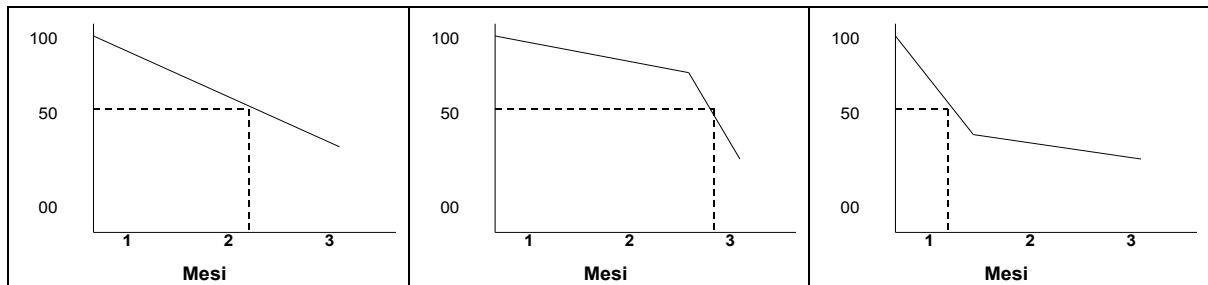
L'analisi della sopravvivenza, affronta e risolve le seguenti categorie di problemi:

- Stima delle funzioni di sopravvivenza.
- Confronto di esperienze di vita di due o più insiemi di animali da esperimento o pazienti sottoposti a trattamenti diversi.
- Valutazione della capacità prognostica di diverse variabili considerate separatamente o contemporaneamente.

La variabile causale d'interesse in uno studio di "sopravvivenza" è rappresentata dal tempo intercorrente tra un momento iniziale definito come "origine delle osservazioni" ed il momento in cui accade un evento terminale solitamente il decesso del paziente. La prognosi non è altro che la stima della probabilità di un certo esito ed è importante che lo statistico conosca la precisione della stima che sta facendo (Feinstein, 1985). Nell'analisi della sopravvivenza siamo interessati a seguire i soggetti per un certo periodo, fintanto che essi non raggiungano un punto di arrivo che può essere la guarigione o la morte. Lo studio sperimentale sulla prevenzione del rischio multiplo (Multiple Risk Factor MRFIT, 1977) ha coinvolto circa 13.000 uomini per un periodo di 27 mesi. In questo tipo di studi è necessario calcolare la durata della sopravvivenza (comunemente si definisce il tempo di follow-up) che può essere effettuato secondo due approcci assai simili: le tavole di sopravvivenza e l'approccio di Kaplan-Maier del 1958 (la curva cambia ogniqualvolta accade un evento) che considerano l'azard, cioè la probabilità che si verifichi un evento in un soggetto che è in osservazione al momento in cui inizia uno specifico intervallo di tempo.



L'analisi della morfologia delle curve di sopravvivenza è estremamente importante per le situazioni nelle quali concentriamo l'attenzione solo sulla sopravvivenza alla fine del follow-up. Al paziente con una malattia grave che pone domande sulla sopravvivenza, i medici spesso rispondono solo sulla base di questo dato. Nella figura sono riportati degli esempi di curve di sopravvivenza con lo stesso follow-up a tre mesi, ma con differente valore mediano di sopravvivenza.



La stima che abbiamo eseguito è una stima campionaria, basata cioè su rilevazioni effettuate su campioni di pazienti con caratteristiche simili a quelle della particolare popolazione. La stima campionaria presenta un certo grado di incertezza che può essere descritto utilizzando i limiti di confidenza al 95%. Peto et al. 1977 offrono un contributo nell'analisi della sopravvivenza in quanto consentono il calcolo dell'errore standard della funzione di sopravvivenza. Il metodo di Kaplan-Maier è il metodo più comunemente utilizzato per rappresentare graficamente e interpretare le curve di sopravvivenza e conseguentemente è il modo con il quale possiamo confrontare due o più curve di sopravvivenza, questo è possibile impiegando un test chiamato log-rank test che deriva concettualmente dal test del chi-quadro in quanto stima le differenze tra valori attesi e valori realmente osservati.

Misure epidemiologiche

La conoscenza dello stato di salute di una popolazione si esprime per mezzo di una serie di misure che stimano i diversi aspetti dello stato di salute della popolazione. Gli scopi dell'epidemiologia sono quelli di descrivere la frequenza e la distribuzione degli eventi e di vagliare eventuali associazioni tra i fattori di rischio individuale o ambientali; avremo in quindi le misure della frequenza degli eventi, le misure di effetto o di associazione e le misure di impatto sulla popolazione.

Le misure della frequenza possono essere:

- Rapporti
- Proporzioni
- Tassi
- Descrizione del numero degli eventi

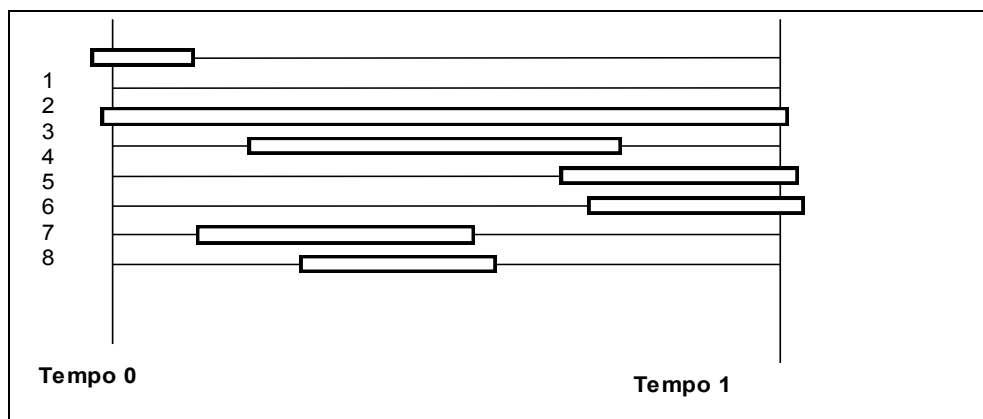
L'indicatore maggiormente impiegato è il tasso, ossia un rapporto tra il numero di soggetti che sviluppano o presentano una patologia e il totale della popolazione a rischio di sviluppare questa patologia in un arco di tempo limitato (solitamente si considera un periodo di un anno).

Le più importanti misure di frequenza degli eventi in epidemiologia sono la prevalenza e l'incidenza.

Prevalenza

La prevalenza indica il rapporto tra numero di casi e numero dei componenti di una determinata popolazione considerata ad un determinato istante. Il termine tasso è improprio, si tratta in realtà di una proporzione (il suo valore è tra 0, nessun ammalato a 100, tutti ammalati). In termini probabilistici la Prevalenza indica la probabilità di estrarre a caso da una popolazione un soggetto con una determinata patologia in atto. Quando è riferita ad una determinato istante viene chiamata come Prevalenza Puntuale, se invece, come spesso accade nella pratica, le informazioni raccolte riguardano un ampio arco temporale, si indica come Prevalenza Periodale.

Nell'esempio sotto riportato avremo una Prevalenza puntuale al tempo $t(0)$ di $2/8 = 25\%$, al tempo $t(1)$ $3/8 = 37\%$, mentre la prevalenza periodale tra $t(0)$ e $t(1) = 7/8 = 87\%$.



Calcolo dell'incidenza e prevalenza puntuale e periodale di una malattia infettiva

Per misurare la Prevalenza di una malattia, si esaminano, in un determinato momento un campione di soggetti della popolazione e si classificano, attraverso metodiche diagnostiche, i soggetti ammalati (i casi) e quelli sani. Questo tipo di indagine è definito anche come studio trasversale o di prevalenza; sovente negli studi di prevalenza vengono misurati oltre all'evento malattia anche i fattori associati alla malattia stessa al fine di identificare relazioni causali tra fattori ed evento della malattia. Gli studi di prevalenza sono molto utilizzati, sono più semplici e molto rapidi nella esecuzione rispetto agli studi di coorte o d'incidenza. A differenza di quest'ultimi però non permettono di verificare il nesso causale tra fattore ed evento. Gli studi di prevalenza hanno quindi un carattere "esplorativo" e sono impiegati per produrre ipotesi di lavoro da verificare con studi più potenti.

Incidenza

È il rapporto o proporzione tra il numero dei soggetti che durante un determinato periodo di tempo sviluppano una determinata malattia. Considera al contrario il numero di nuovi eventi in una popolazione ed in un determinato periodo di tempo, solitamente un anno: in questo caso si considera il rapporto tra i nuovi casi e i soggetti a rischio, cioè i soggetti non ammalati al momento del periodo di osservazione. Nell'esempio riportato avremo 5 soggetti che si ammalano su 6 soggetti a rischio (8-2), quindi si avrà una incidenza dell' 83%.

In termini probabilistici l'Incidenza è una probabilità condizionata e misura il Rischio (Probabilità) che un individuo, esente dalla malattia (Condizione) ha di contrarre la malattia durante il tempo t di osservazione. L'incidenza si misura attraverso gli studi di coorte o d'incidenza, in cui una coorte di soggetti a rischio (cioè non ammalati) viene seguita per un determinato periodo di tempo, durante il quale si registrano il numero di nuovi casi che si sviluppano nella coorte. Analogamente agli studi di prevalenza anche in questa tipologia di studi di solito vengo anche acquisite informazioni su potenziali fattori di rischio, al fine d'indagare l'associazione con l'evento. In questa tipologia di studio è possibile anche studiare il nesso di causalità tra fattore ed evento.

Nel caso in cui una malattia mostri un decorso prolungato (cioè si ha una successione di momenti diagnostici o di follow-up), maggiore sarà la probabilità che questa venga inclusa in uno studio di prevalenza. Esiste quindi una espressione che mette in relazione l'incidenza, la prevalenza e la durata della malattia.

$$\text{Prevalenza} = \text{incidenza} \times \text{durata della malattia}$$

Dividendo la prevalenza per l'incidenza si ottiene la durata media della malattia nel suo complesso.

La conoscenza delle **misure di frequenza delle malattie** è necessaria per tre finalità: ipotizzare ciò che accadrà, descrivere i fenomeni biologici nella realtà in cui si verificano ed effettuare dei confronti (Friedman, 1977). La difficoltà è rappresentata dal modello operativo che vogliamo utilizzare. Molti domini applicativi richiedono la raccolta di una grossa quantità di dati temporali e l'astrazione di tali dati in concetti di alto livello rilevanti nello specifico dominio. Per esempio nel monitoraggio a lungo termine è necessario raccogliere, analizzare ed interpretare serie di dati raccolti su lunghi periodi al fine di effettuare una corretta valutazione dell'evoluzione clinica dei pazienti e della risposta alle terapie in corso.

Parametro	Numeratore	Denominatore	Periodo	Tipologia
Incidenza	Nuovi casi in un gruppo privo di malattia.	Tutti gli individui inclusi i casi e non casi. <i>Popolazione a rischio.</i>	Periodo di sorveglianza.	Studio di Coorte.
Prevalenza	Tutti i casi evidenziati	<i>Tutti gli individui.</i>	In un preciso istante.	Studio di prevalenza o trasversale.

L'epidemiologo deve prendere in considerazione l'intero set delle variabili cliniche osservate sul soggetto o sulla popolazione e con vari processi di astrazione e di ragionamento, estrarre le informazioni più significative per i propri scopi decisionali. Esiste un'ampia letteratura al riguardo delle strategie e tecniche da adottare all'analisi dei dati, ma sovente questi metodi presentano dei limiti dovuti alla tipologia dei dati che nel caso dei dati epidemiologici di monitoraggio presentano alcune peculiarità.

- I dati sono di tipo eterogeneo (sia numerici che qualitativi).
- La griglia temporale di rilevamento è generalmente irregolare.
- I dati sono soggetti ad errori di misura (molto spesso le rilevazioni vengono effettuate da persone diverse).
- I dati raccolti hanno una granulosità temporale (cioè sono raccolti in tempi diversi).

La scelta del modello rappresenta una difficoltà non sempre facile da superare, nello schema sotto riportato è possibile individuare una strategia che parte dall'analisi semplificata delle conoscenze.

	Meccanismo sconosciuto	Meccanismo conosciuto
Pochi dati	Esperto	Modellizzazione Matematica
Molti dati	Modellizzazione Matematica	Modellizzazione Statistica

Il ricorso alla modellizzazione matematica ha trovato un impiego notevole nell'analisi delle malattie infettive, senza addentrarci troppo in questo interessante settore possiamo considerare l'esistenza di diversi approcci (Abby 1952).

- **Modelli Empirici** (basati sul metodo del curve fitting) sono basati sull'esperienza, piuttosto che su precisi principi scientifici; il modello descrive ad esempio l'andamento dell'epidemia, ma non spiega le interazioni necessarie per la trasmissione.
- **Modelli Deterministici** sono quelli creati sulla base delle conoscenze a priori della malattia e della modalità di trasmissione, vengono quindi forniti dei parametri descrittivi del modello solitamente a compartimenti.
- **Modelli Stocastici o Probabilistici.** Sono quei modelli che prevedono il ricorso al calcolo delle probabilità, in particolare la binomiale, questi modelli possono essere realistici, ma sono decisamente complessi.
- **Modelli di Simulazione al computer.** I sistemi biologici sovente sono troppo complessi per una soluzione matematica analiticamente corretta, si ricorre quindi alla simulazione estraendo le relazioni epidemiologiche essenziali e simulando l'evolversi dell'epidemia al computer. La simulazione al computer è sovente una procedura complessa che richiede poi la validazione del modello, quindi la comparazione dei risultati del modello con la realtà epidemiologica.

Il modello di Reed e Frost ad esempio descrive la curva in una epidemia ed è definito sulla base matematica che prevede la suddivisione della popolazione in tre gruppi che comprendono animali infetti, animali recettivi, e soggetti immuni. Il modello considera che ogni animale infetto vada incontro a malattia e successivamente guarisca e poi diventi immune.

I processi di modellizzazione della realtà in medicina e biologia si presentano come una delle sfide più interessanti e più complesse della ricerca scientifica, questi processi nascono dall'unione di Intelligenza Artificiale, Informatica e Teoria delle Probabilità, e permettono al medico, al ricercatore l'analisi intelligente dei dati.

Dobbiamo ora richiamare alcuni concetti sulla medicina basata sull'evidenza dei dati (traduzione del termine EBM = *Evidence Based Medicine*) che può essere tradotta come una medicina dove le decisioni sono basate su fatti prodotti in ambito scientifico. Da questa prima definizione scaturisce che l'inferenza scientifica deriva dalla sperimentazione. Sackett et al. (1997) definiscono quindi l'EBM come l'utilizzazione coscienziosa, esplicita e giudiziosa dei fatti e delle prove (evidence) attuali finalizzati a prendere delle decisioni di terapia individuale.

Livello A	PROVA SCIENTIFICA basata su prove potenti di qualità, meta-analisi, ...
Livello B	PRESUNZIONE SCIENTIFICA basata su prove di bassa potenza, studi comparativi non randomizzati....
Livello C	STUDI DI BASSO LIVELLO DI PROVA studi caso controllo, serie di casi
Livello D	ACCORDO DI ESPERTI

Come ci appare ormai chiaro, la ricerca dei fatti deve avvenire seguendo dei precisi modelli; l'esplosione delle informazioni ha prodotto come risultato un aumento vertiginoso delle riviste specializzate, una vita media utile dei libri scientifici ridotta, il tutto accompagnato con dei tempi dedicati alla lettura e all'aggiornamento limitati. Esistono quindi dei diversi livelli o gradi di affidabilità delle informazioni o livelli di prova.

Valutazioni oggettive

Nel processo di misurazione della frequenza di malattia un importante passo è la capacità di effettuare una classificazione tra soggetti ammalati e sani, cioè eseguire una diagnosi. La corretta classificazione in sotto popolazioni attraverso l'applicazione di procedure diagnostiche è fondamentale per ridurre la possibilità di errori nella stima dei parametri epidemiologici. I medici effettuano una diagnosi con un procedimento che utilizza un giudizio probabilistico che può fornire risultati più o meno accurati sulla base dei test diagnostici utilizzati. Il test risulta corretto e positivo quando viene diagnosticata la presenza della malattia, oppure negativo quando non si ha la malattia. Il test può risultare errato quando non viene segnalata la malattia (FALSO NEGATIVO) oppure il test segnala la malattia anche quando questa non è in realtà presente (FALSO POSITIVO).

	Presente	Assente
Positivo	Vero positivo	Falso positivo
Negativo	Falso negativo	Vero negativo

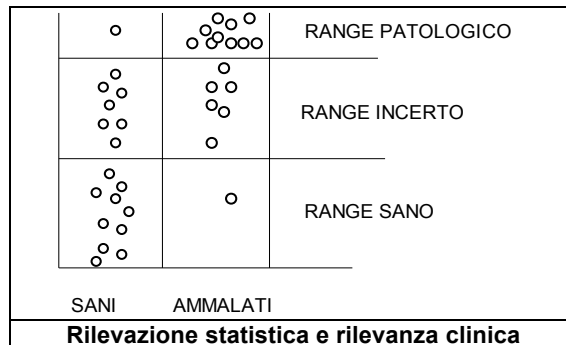
La valutazione dell'accuratezza è quindi finalizzata alla scelta dei metodi che ci facciano conoscere se è presente o meno la malattia, questa valutazione viene definita con il termine di *gold standard* (Sackett 1978). Un buon livello standard può essere raggiunto anche con indagini semplici e poco costose prima di utilizzare metodiche sofisticate e costose. Nella pratica comune in medicina le analisi più aggressive vengono realizzate solo dopo aver osservato risultati positivi nei test diagnostici preliminari (Fletcher et al., 1987).

Valore predittivo

È la più comune modalità di utilizzazione delle informazioni sul rischio o sul risultato di un test per la predizione dell'incidenza di una malattia. Rappresenta il risultato di un test, o meglio la probabilità che da esso si ricava. In modo molto semplice e forse banale possiamo affermare che il valore predittivo costituisce la risposta alla domanda: se il risultato del test è positivo quante sono le probabilità che il soggetto sia affetto da malattia?

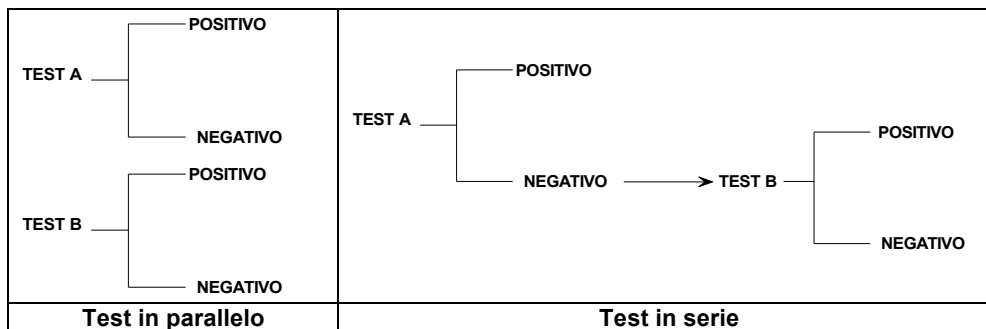
Il valore predittivo di un test è legato alla sensibilità e alla specificità del test stesso e alla prevalenza della malattia nella popolazione data. È evidente quanto più il test è sensibile, tanto maggiore sarà il valore predittivo negativo del test stesso. Mentre più specifico sarà il test migliore sarà il suo valore predittivo positivo. Spesso vengono messe in luce differenze statisticamente significative nei test tra coloro che presentano la malattia e i soggetti che non presentano la malattia. L'attendibilità dell'informazione predittiva è basata sulla similarità tra le caratteristiche dei soggetti su cui si è valutato il rischio e quelle dei soggetti sui quali si effettua la predizione. La

prevalenza della malattia rappresenta la probabilità pre-test di malattia nel soggetto che stiamo valutando, se utilizziamo le semplici equazioni derivate dal teorema di Bayes delle probabilità condizionali, potremmo avere la probabilità post-test di malattia, cioè la probabilità di avere o non avere una malattia sulla base del test (Bradley et al., 1996). L'utilizzo del *likelihood ratio* consente di avere una sequenza di test e quindi di potenziare la precisione diagnostica (Halkhin et al., 1998).



Test multipli

Poiché i test diagnostici che possiamo utilizzare non sono perfetti, ma presentano una specificità e una sensibilità inferiori al 100%, i comuni test hanno la possibilità di diagnosticare una malattia tra il 10 e 90%; e chiaramente è necessario ricorrere a molteplici test per l'interpretazione diagnostica aumentando la probabilità di trovare che il soggetto è affetto o meno da una malattia (Dall'Aglio 2000). I test multipli possono essere impiegati secondo due differenti strategie: o in parallelo oppure in serie. Nel caso in cui tutti i test diano tutti risultati positivi o tutti negativi l'interpretazione diagnostica è facile, al contrario quando i risultati sono discordanti.



I test in parallelo vengono adottati quando si rende necessaria una rapida valutazione del caso. A parità di prevalenza l'uso dei test multipli in parallelo aumenta la sensibilità e quindi il valore predittivo negativo, per contro si aumenterà la probabilità di avere soggetti senza malattia diagnosticati come positivi. Nell'esempio di seguito sono riportati gli effetti delle combinazioni di due test.

Test	Sensibilità %	Specificità %	Valore Predittivo Positivo	Valore Predittivo Negativo
A	80	60	33	92
B	90	90	69	97
A e B in parallelo	98	54	35	99
A e B in serie	72	96	82	93

L'applicazione dei test in parallelo comporta quindi dal punto di vista pratico l'analisi di tabelle di contingenza, come quella di seguito riportata.

Test A	Test B	Positivi	Negativi	Totali
Uno o entrambi Positivi		81	10	91
Entrambi Negativi		5	104	109

I test in serie sono utilizzati nelle situazioni nelle quali i soggetti possono essere seguiti nel tempo, in ogni caso con il test in serie si fa un ricorso minore alle analisi di laboratorio in quanto il secondo test viene effettuato solo dopo aver conosciuto il responso del primo test. Questo tipo di approccio è utile quando nessuno dei test disponibili è dotato di elevata specificità.

Test	Sensibilità (%)	Specificità (%)
CPK	96	57
AST	91	74

LDH	87	91
CPK, ALT, LDH	78	95

Da Galen et al., 1975 modificato.

Dal punto di vista applicativo l'uso sequenziale determina un aumento della specificità, anche se associato ad una relativa diminuzione della sensibilità. Nella tabella viene riportato l'aumento della specificità con test in serie nella diagnosi dell'infarto miocardico. Quando utilizziamo test multipli, dobbiamo considerare l'indipendenza del test, cioè che il test successivo non deve riprodurre le informazioni che sono già note. In realtà questo non avviene e di fatto si tende a sovrastimare il valore del test e quindi la probabilità della malattia.

Misure di associazione

Tra gli obiettivi di uno studio epidemiologico vi è la valutazione della presenza di un'associazione tra un potenziale fattore di rischio e l'evento patologico oggetto dello studio. La misura di tale associazione avviene attraverso il calcolo di parametri quali: il Rapporto di Prevalenza, il Rischio relativo e l'Odds Ratios. In generale si può affermare che le misure di associazione si ottengono rapportando tra loro la misura della frequenza della malattia nel gruppo di soggetti esposti al fattore di rischio e la frequenza di malattia tra i soggetti non esposti al rischio. In generale quindi vale la seguente formula:

$$\text{Misura di associazione} = \frac{\text{Frequenza malattia nei soggetti esposti}}{\text{Frequenza malattia nei soggetti non esposti}}$$

Il rapporto di cui sopra può dare diversi risultati:

- quando le frequenze sono uguali il rapporto sarà 1 indica che non vi è nessuna associazione tra il fattore di rischio e la malattia.
 - se la frequenza della malattia è maggiore tra gli esposti il rapporto sarà un numero superiore a 1 e indica che vi è associazione tra esposizione e malattia, ed in particolare l'esposizione al fattore di rischio aumenta la probabilità di malattia nei soggetti, rispetto ai non esposti (fattore di rischio).
 - se la frequenza della malattia è minore tra gli esposti che tra i non esposti il rapporto sarà inferiore a uno e indica che l'esposizione al fattore indagato previene la malattia (fattore preventivo).
 - nel caso la malattia sia presente solo tra gli esposti, il rapporto assume valori infinito, e indica che il fattore di esposizione è causa necessaria e sufficiente per la malattia
 - nel caso in cui la malattia sia presente solo tra i soggetti non esposti al rischio, il rapporto assume valori uguali a zero e indica che l'esposizione al fattore indagato permette la completa eliminazione del rischio di malattia.
- A seconda della tipologia di studio epidemiologico si possono ricavare differenti misure di associazione, in tabella è riportata un confronto tra tipo di studio e misure di frequenza, di associazione e di effetto, che possono essere calcolate.

Tipo di Studio	Misure di frequenza	Misure di associazione	Misure di effetto
Trasversale	Prevalenza	Rapporto di Prevalenza	Rischio Attribuibile di popolazione (utilizzando la prevalenza)
Caso-Controllo	Nessuna	Odds-Ratio	Frazione eziologica Frazione eziologica della popolazione
Coorte	Incidenza	Rischio Relativo	Rischio Attribuibile Rischio attribuibile della Popolazione Frazione Eziologica Frazione eziologica della popolazione

La validità dell'associazione è maggiore quando studi condotti in tempi diversi, in aree differenti, con chiaramente soggetti diversi, giungono alle stesse conclusioni, in questo caso la validità dell'associazione risulta aumentata, la casualità gioca un ruolo minore negli studi condotti con metodologie e materiali diversi.

Misure d'effetto

Se le misure di associazione esprimono la forza dell'associazione tra esposizione e malattia, le misure d'effetto sono importanti perché forniscono una quantificazione dell'importanza del fattore di esposizione nell'aumentare o meno la probabilità di malattia. Le misure d'effetto indicano di quanto, l'evento malattia, potrebbe essere prevenuto se il fattore di rischio fosse neutralizzato, rimosso o evitato. La seguente tabella illustra le principali misure di effetto, il loro significato e le modalità di calcolo

Misure di effetto	Quesito	FORMULA
Rischio Attribuibile	Qual è il valore dell'incidenza di malattia attribuibile alla esposizione?	$RA = I_{\text{esposti}} - I_{\text{non esposti}}$
Rischio Attribuibile di popolazione	Incidenza di una malattia in una determinata popolazione in cui agisce un fattore di rischio.	$RA_p = RA \times P$
Frazione di rischio Attribuibile di popolazione	Quota di una malattia in una determinata popolazione in cui agisce un fattore di rischio.	$FA_p = RA_p / R_t$

Dove I= Incidenza; P= Prevalenza di esposizione al fattore di rischio; R_t=Incidenza totale di malattia in una popolazione.

Un esempio potrà chiarire meglio i meccanismi di calcolo delle misure di associazione e di effetto e la loro interpretazione:

Fumo di sigaretta e mortalità per cancro al polmone

Misure di frequenza

Tasso di mortalità per cancro al polmone nei fumatori	0.96/1000/anno
Tasso di mortalità per cancro nei non fumatori	0.07/1000/anno
Prevalenza dei fumatori	56%
Tasso di mortalità totale per cancro ai polmoni	0.56/1000/anno

Misura di associazione

Rischio Relativo	0.96/0.07= 13.7
------------------	-----------------

Misure di effetto

Rischio Attribuibile	$RA = I_{\text{esposti}} - I_{\text{non esposti}}$	0.96/1000 anno - 0.07/1000/anno	0.89
Rischio Attribuibile di popolazione	$RA_p = RA \times P$	0.89 x 0.56	0.50
Frazione di rischio Attribuibile di popolazione	$FA_p = RA_p / R_t$	0.50/0.56	0.89

Da Dolley et Hill 1964

Popolazione a rischio

Un modo per valutare il rischio deriva dalla semplice domanda sul ruolo giocato dal fattore di rischio responsabile della malattia in una popolazione o nei singoli individui. La risposta a questo quesito implica rispondere alla domanda se quel particolare fattore di rischio è importante per la salute di quel gruppo o del singolo individuo. In questo modo è possibile identificare le strategie della politica sanitaria. Nello stimare il rischio in una popolazione è necessario tenere in considerazione la frequenza con la quale i membri della popolazione sono esposti al fattore di rischio. Un fattore di rischio debole, ma con alta prevalenza nella popolazione potrebbe contribuire maggiormente come rischio di malattia rispetto ad un rischio forte ma con bassa distribuzione.

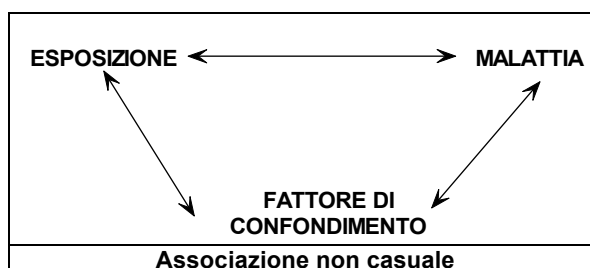
Misure di associazione e rapporto causa-effetto

Si definisce come causa un qualcosa che provoca un effetto o semplicemente un risultato; nel linguaggio medico la causa ha molti sinonimi: eziologia, patogenesi... La fase di accertamento della causa consente di programmare correttamente interventi di prevenzione o di diagnosi e di trattamento. L'associazione rappresenta il grado di dipendenza statistica tra due o più eventi, che si verificano insieme con una frequenza maggiore di quanto ci possa attendere per effetto del caso. In generale l'associazione non implica necessariamente una relazione casuale (rapporto causa-effetto); l'associazione può essere casuale o etiologica, secondaria o indiretta o spuria. L'associazione è secondaria quando riguarda il caso in cui due o più eventi sono in relazione tra loro poiché esiste un fattore casuale comune. Criteri per stabilire la casualità di una associazione sono di seguito riportati nella tabella.

- 1-Sequenza o relazione temporale.
- 2-Plausibilità biologica.
- 3-Dimensione del rischio relativo.
- 4-Effetto biologico (dose-rischio, durata-rischio).
- 5-Consistenza. Studi diversi hanno portato a risultati simili. (meta-analisi).
- 6-Specificità. Una causa produce un effetto.
- 7-Reversibilità. La riduzione all'esposizione riduce i tassi di malattia.
- 8-Analogia.
- 9-Assenza di fattori di confondimento.
- 10-Relazione dose-risposta.
- 11-Reversibilità (la rimozione della causa riduce l'incidenza).

da Hill A.B. Environment and disease: association or causation. 1965 Modificato.

Un'associazione causa-effetto è quindi molto probabile quando più elementi concorrono a rafforzarla si può quindi dare una rappresentazione del livello della associazione nella relazione causa-effetto. Dobbiamo comunque rilevare che la presenza simultanea di due o più fattori di rischio può creare situazioni di sinergismo, che possono comportare un sinergismo positivo oppure un sinergismo negativo.



Si possono chiaramente quindi identificare i fattori di rischio che possono essere:

Predisponenti, se aumentano la suscettibilità del soggetto;

Precipitanti se facilitano il definitivo instaurarsi della malattia;

Rinforzanti se tendono ad aggravare la presenza della malattia. Un ultimo requisito è quello che nella associazione causale non vi siano presenti fattori di rischio (Hill, 1966).

Nel caso degli animali dobbiamo considerare anche un elemento importante che è rappresentato dal contatto e dalla durata del contatto, la durata della contagiosità condiziona il numero dei soggetti che possono venire colpiti dalla specifica patologia; la patogenesi quindi può influenzare la probabilità di trasmissione (aerosol, contatto, inalazione, ..., Egg Drop Syndrome).

La scelta del metodo di valutazione del grado di associazione fra due variabili dipende dal tipo di variabile che viene misurata. Per variabili di tipo continuo possiamo ad esempio adottare i metodi statistici tradizionali come la regressione e la correlazione (Greppi et al., 2000), mentre quando i dati sono espressi come variabili categoriche, i soggetti vengono classificati a seconda del fattore di rischio (presente/assente, vivo/morto) collocando i dati in tabelle di contingenza 2x2.

Tipo di studio	Fattore di rischio	
	Presente	Assente
<i>Epidemiologici</i>		
Esito Favorevole	a	b
Esito Sfavorevole	c	d
<i>Studi di Intervento</i>	Farmaco	Placebo
Esito Favorevole	a	b
Esito Sfavorevole	c	d

Negli studi prospettici i gruppi vengono definiti a priori sulla base del fattore di rischio, mentre negli studi retrospettivi la selezione avviene sulla base dell'esito (favorevole o sfavorevole).

Interpretazione del significato dell'associazione tra fattore di rischio e malattia

Individuata un'associazione tra un fattore di rischio e la malattia oggetto dello studio, non si è autorizzati a dichiarare che l'associazione è vera, perché potrebbe essere dovuta a due ordini di errori: *Errori casuali* dovuto al campionamento della popolazione indagata, e ad *errori sistematici* conosciuti anche come Bias.

Nel primo caso, l'applicazione dei comuni test statistici (χ^2 , test esatto di Fisher, stima degli intervalli di confidenza della misura di associazione) permettono di dichiarare con un predeterminato livello di confidenza, se l'associazione riscontrata è significativa o è da attribuire alla variabilità biologica.

Mentre il controllo dell'errore sistematico è più complesso. Innanzitutto esistono diverse fonti di Bias tra queste ricordiamo:

Bias di Selezione (si compie ogni qualvolta vengono selezionati per lo studio elementi non rappresentativi della popolazione target).

Bias di Classificazione (sono gli errori di misura dovuti all'imperfezione dei test diagnostici).

Bias di Ricordo (tipici degli studi caso-controllo, in cui si cerca di ricostruire retrospettivamente la storia espositiva del caso o del controllo, molte delle informazioni sono "ricordate" e quindi soggette ad errore).

Bias di Informazione (si riferiscono ad errori nella rilevazione delle informazioni sui fattori espositivi).

Bias di Confondimento si utilizza il termine di confondimento per indicare che una variabile può "oscurare", confondere l'effetto della variabile in esame sulla patologia considerata. In pratica si ottengono delle stime delle misure di associazione "distorte" sia nel senso di una sovrastima che di una sottostima del parametro epidemiologico. Quando le informazioni sul fattore confondente sono precise ed accurate è possibile applicare le procedure di calcolo statistico per avere una stima aggiustata dell'associazione con la malattia, in questo caso si ricerca la standardizzazione degli effetti di uno o più confondenti. Un tipico esempio è quello del confondimento operato nella stima dell'esposizione al fumo sulla stima del rischio di infarto per l'esposizione all'alcool.

Dimensioni del campione in uno studio epidemiologico e clinico

La dimensione campionaria rappresenta la domanda fondamentale che ci si pone prima di affrontare qualsivoglia studio epidemiologico e clinico mirato a stimare la prevalenza/incidenza di una malattia, l'associazione tra fattore di rischio e malattia o a saggiare la differenza tra due trattamenti.

Negli studi epidemiologici ci si trova di fronte a due tipologie di problemi relativi alla dimensione del campione da utilizzare:

1. Verificare la presenza/assenza di una malattia in una popolazione.
2. Stimare la prevalenza della malattia.

Le modalità di calcolo sono differenti, ma nella sostanza occorre disporre d'informazioni preliminari sulla Prevalenza che ci si attende nella popolazione, sulla probabilità di errore che si è disposti ad accettare nel dichiarare la presenza di malattia quando in realtà non è presente (errore di I° tipo – livello di confidenza), l'errore che si è disposti ad accettare nel dichiarare che una popolazione è indenne dalla patologia quando in realtà è presente ad un determinato livello (errore di II° tipo – Potere), nel caso della stima della prevalenza di una malattia occorre anche fornire il livello di precisione della stima che si desidera ottenere. Queste informazioni sono relazionate tra loro in formule matematiche che forniscono come risultato il numero minimo di individui da campionare per perseguire gli obiettivi posti dallo studio. Riteniamo utile fornire un esempio d'interpretazione del risultato di uno studio di dimensione del campione per la valutazione della presenza/assenza di una malattia e per la stima della prevalenza.

Esempio:

Si desidera conoscere il numero di allevamenti di polli necessari per verificare la presenza/assenza del virus della Pseudopeste aviaria nella regione Lombardia.

Le informazioni per il calcolo sono: Numero di allevamenti presenti in regione Lombardia= 1200

Prevalenza attesa: in questo caso se si presume indenne l'area indagata si può ipotizzare una prevalenza inferiore al 1%, in altre realtà potrebbe essere più elevata, comunque è chi effettua l'indagine che deve fornire una risposta a questa domanda rispetto all'esperienza, alla conoscenza territoriale, alla letteratura, alla storia della malattia ecc.,

errore di 1° tipo= 5% (livello di confidenza del 95%).

errore di secondo tipo= 20% (potere dell'80%).

Questi ultimi due parametri sono normalmente settati su questi livelli, in quanto si ritiene che per le normali indagini siano più che sufficienti per conferire validità allo studio.

Utilizzando un software dedicato al calcolo della dimensione del campione si ottiene il seguente risultato: 264.

Premesso che, in termini statistici l'ipotesi nulla o H0 che si vuole verificare è che la malattia sia presente ad un livello inferiore all'1%, di contro l'ipotesi alternativa H1 è che la malattia sia presente ad un livello superiore o uguale all'1%, il risultato ottenuto indica che: per evidenziare 80 volte su 100 (Potere dello studio) la presenza del virus della Pseudopeste aviaria, in una popolazione di 1200 allevamenti, supponendo una prevalenza inferiore al 1%, è necessario esaminare 264 allevamenti, con questo campionamento 5 volte su 100 (errore di 1° tipo) saranno classificati, erroneamente, come allevamenti positivi, allevamenti che in realtà sono indenni o per lo meno hanno un livello di prevalenza inferiore all'1%. In base alle esigenze contingenti e alla tipologia della malattia sotto indagine, si potrà decidere se diminuire l'errore di 1° tipo, cioè ridurre la probabilità di dichiarare un allevamento infetto, quando in realtà non lo è, oppure ridurre l'errore di II tipo che si commette nel dichiarare un allevamento indenne, quando in realtà è infetto. Perché il campionamento sia efficace gli allevamenti dovranno essere selezionati secondo criteri probabilistici di casualità, operando in modo che tutti gli allevamenti potenzialmente selezionabili, abbiano tutti la stessa probabilità di essere estratti.

Come appare logico attendersi minore è la differenza nell'efficacia dei trattamenti maggiore sarà numerosità del campione che dobbiamo utilizzare. Per rispondere correttamente a questa domanda dobbiamo prima rispondere a tre importanti quesiti preliminari.

- *Differenza minima che riteniamo importante mettere in evidenza.*
- *Quale è il valore medio della variabile di risposta nel gruppo di controllo.*
- *Quale è il grado di incertezza che siamo disposti a tollerare.*

Le possibilità operative divergono e diventa importante conoscere la natura dei dati di cui disponiamo. Se trattiamo dati di tipo qualitativo oppure dati di tipo quantitativo dobbiamo utilizzare strategie statistiche diverse (Valsecchi e La Vecchia, 1999).

Nei riquadri tratteremo le procedure da adottare per il dimensionamento del campione.

Dati di tipo qualitativo
P_1 = percentuale di casi positivi che ci si deve attendere nel trattamento standard.
P_2 = percentuale di casi positivi che ci si deve attendere nel trattamento sperimentale.
α = livello di significatività in un test a due code (falsi positivi).
$1-\beta$ = grado di certezza legato alla potenza del test.

Se disponiamo dei seguenti dati $P_1 = 30\%$; $P_2 = 50\%$; $\alpha = 0.05$; $\beta = 0.1$

Avremo

$$n = \frac{P_1 \times (100 - P_1) + P_2 \times (100 - P_2)}{(P_2 - P_1)^2} \times f(\alpha, \beta)$$

E sostituendo si ottiene:

$$n = \frac{30 \times (100 - 30) + 50 \times (100 - 50)}{(50 - 30)^2} \times 10.5 = 121$$

Nel caso in cui si debbano trattare dati di tipo quantitativo si devono considerare i seguenti parametri

Dati di tipo quantitativo
μ_1 = Risposta media del gruppo di controllo.
σ = Errore standard della risposta nel gruppo di controllo.
μ_2 = Risposta media del gruppo sperimentale.
α = livello di significatività in un test a due code (falsi positivi).
$1-\beta$ = grado di certezza legato alla potenza del test.

Se per esempio stimiamo di avere i seguenti parametri: $\mu_1 = 10$; $\sigma = 9$; $\mu_2 = 7$; $\alpha = 0.05$; $\beta = 0.05$

$$n = \frac{2\sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} \times f(\alpha, \beta)$$

da cui sostituendo avremo

$$n = \frac{2 \times 9^2}{(10 - 7)^2} \times 13.5 = 234 \quad \text{Uno dei maggiori epidemiologi}$$

afferma comunque che "Nelle sperimentazioni cliniche sulla mortalità (il concetto può essere esteso a qualsiasi evento clinico) la capacità di distinguere tra l'efficacia di due trattamenti dipende da quanti pazienti sono morti (oppure hanno presentato un certo evento) e non dal numero totale dei pazienti trattati" (Peto et al., 1976).

Conclusioni

L'analisi matematico-statistica degli eventi che interessano la medicina, potrebbe apparire cosa universalmente accettata, ma purtroppo i metodi numerici introdotti già da due secoli faticano a diffondersi. Nel settore dell'epidemiologia il matrimonio tra conoscenza del dominio e le tecniche di analisi statistiche classiche ed innovative come le reti neurali e l'inferenza bayesiana, la modellistica si reggono su strumenti metodologici e formali che consentono di prevedere un sempre maggiore utilizzo di queste metodologie. In questa breve rassegna si è cercato di caratterizzare la tipologia delle informazioni per far comprendere l'utilità degli strumenti statistici per la valutazione di grandi moli di dati che attualmente si producono anche a livello di semplice azienda zootecnica.

Bibliografia

1. Abby H. (1952) "An examination of the Reed-Frost theory of epidemics." Human Biology 24, 201-233.
2. Altman D.G. (1991) "Practical Statistics for Medical Research." Ed. Chapman & Hall.
3. Bellazzi R., Larizza C. (1999) "Sistemi di supporto alle decisioni per l'analisi intelligente di dati biomedici". In Strumenti innovativi per la ricerca nelle produzioni animali. Ed. G.F. Greppi, G. Enne
4. Benard H.J., Stark K.D.C., Morris R.S., Pfeiffer D.U., Moser H. (1999) "The 1997-1998 classical swine fever epidemic in The Netherlands- a survival analysis." Prev. Vet. Med. Vol. 42 pag.235-246
5. Bradley P. Carlin, Thomas A. (1996) "Bayes and Empirical Bayes Methods for Data Analysis". Ed. Chapman & Hall.
6. Dall'Aglio G. (2000) "Calcolo delle probabilità." Ed. Zanichelli.
7. Feinstein A.R. (1985) "Clinical Epidemiology. The architecture of clinical research." Ed. WB Saunders. Philadelphia
8. Fletcher R.H., Fletcher S.W., Wagner E.H. (1987) "Epidemiologia clinica". Ed. Luigi Pozzi.
9. Freund R.J., Wilson W.J. (2001) "Metodi statistici". Ed. Piccin.
10. Friedman G.D. (1977) "Medical usage and abuse, prevalence and incidence" Ann. Int. Med. 84, 502-504.
11. Greppi G.F., Galli A., Roncada P. (2000) "Biostat. Appunti di statistica per biotecnologie": Ed. MG. Milano
12. Halkin A., Reichman J., Schawaber M., Paltiel O., Brezis M. (1998) "Likelihood ratio ratios: getting diagnostics testing into perspective" Q J Med. 91, 247-258.
13. Hill A.B. (1966) "Statistical evidence and inference". Oxford Univ. Press
14. Jekel J.F., Elmore J.G., Katz D.L., (1996) "Epidemiologia, biostatistica e medicina preventiva" EdiSES Napoli.
15. Kaplan E.L., Maier P. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. J of American Stat. Ass. 53, 457-485.
16. MIRFIT Group (1977) "Statistical Design considerations in the NHLI multiple Risk Factor Intervention Trial." J. of Chronic Disease, 30:261-275.
17. Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Van der Hoofd C.M., Graast E.A.M. (1997) "Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology". Wageningen Pers. Wageningen, The Netherlands 1997.
18. Peto R., Pike M.C., Armitage P. (1976) "Design and analysis of randomised clinical trials requiring prolonged observation of each patient." Br. J. Cancer 34, 585-612.
19. Peto R., Pike M.C., Armitage P. (1977) "Design and analysis of randomised clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II Analysis and examples." Br. J. Cancer 35, 1-39.
20. Sackett D.L. (1978) "Clinical diagnosis and the clinical laboratory." Clin. Invest. Med. 1, 37-43.
21. Sackett D.L., Richardson W.S., Rosenberg W., Haynes R.B. (1997) "Evidence Based Medicine". How to practice & teach EBM: Ed. Churchill Livingstone. N.Y.
22. Signorelli C. (2000) "Elementi di metodologia epidemiologica". Ed. Universo Roma.
23. Valsecchi M.G., La Vecchia C. (1999) "Epidemiologia e metodologia clinica". Ed. Accademia Nazionale di Medicina.

RELAZIONE 2**FATTORI DI RISCHIO ASSOCIATI CON I FOCOLAI DI MALATTIA DI GUMBORO IN FORMA CLINICA ACUTA. NEI GRUPPI DI BROILER IN DANIMARCA NEL 1998^A E 1999^B****A Mimi Folden Flensburg^{1,3}, Poul Jørgensen² and Annette Kjær Ersbøll³****B Mimi Folden Flensburg^{1,3}, Henrik Stryhn¹, Poul Jørgensen² and Annette Kjær Ersbøll³**¹Danish Veterinary Laboratory, Bülowsvej 27, DK-1790 Copenhagen V, Denmark, ²Danish Veterinary Laboratory, Hangøvej 2, DK-8200 Aarhus, Denmark, ³Royal Veterinary- and Agricultural University, Bülowsvej 13, DK-1870 Frederiksberg, Denmark.

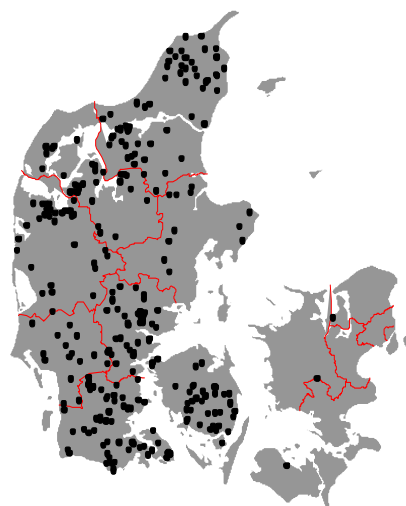
Parole chiave: malattia di Gumboro, indagine epidemiologica, definizione fattori di rischio

Risk factors associated with outbreaks of acute clinical Infectious Bursal Disease among Danish broiler chickens in 1998^a and in 1999^b

Key words: Infectious Bursal Disease, epidemiological investigation, risk factors assessment

Correspondence: Mimi Folden Flensburg - Danish Veterinary Laboratory - Bülowsvej 27, DK-1790 Copenhagen V – Denmark - e-mail: mimi@kvl.dk**Introduzione**

La "Infectious Bursal Disease (IBD)" è una delle principali tematiche che riguardano l'industria avicola in Europa all'interno della Comunità Europea. Nel 1987, sono comparsi i ceppi virali IBD ipervirulenti, fatto che ha causato un notevole aumento delle perdite economiche nell'industria avicola. All'incirca tre giorni dopo l'infezione i ceppi ipervirulenti causano una improvvisa ed elevata mortalità nei gruppi sensibili, fino al 25% nei broilers e al 60% nelle ovaiole (van den Berg *et al.*, 2000). Da qui in avanti la malattia clinica causata da ceppi IBD ipervirulenti verrà definita come IBD altamente virulenta (vvIBD).

**Figura 1:** Dislocazione geografica delle 350 aziende di broilers**Figure 1:** The location of Denmark's 350 broiler chicken producers

Ogni anno circa 350 allevatori Danesi producono circa 120 milioni di broiler. La produzione è concentrata nella parte occidentale del paese: La Danimarca ha un'estensione di circa 43000 km² (Figura 1). Nel Paese i ceppi vvIBD sono stati identificati per la prima volta nel 1992, quando vennero colpite 11 aziende. Nel 1998 si è ripresentata in 36 aziende di broiler, e nel 1999 in altre 61 aziende di broiler. In tutte le aziende infette i gruppi di broiler sono stati vaccinati con vaccini intermedi per tre rotazioni consecutive dopo il focolaio iniziale.

Sono state realizzate due indagini epidemiologiche, allo scopo di identificare i fattori di rischio associati rispettivamente alla ricomparsa della vvIBD in

Danimarca dal gennaio a Marzo 1998 e ai focolai di vvIBD nel 1999.

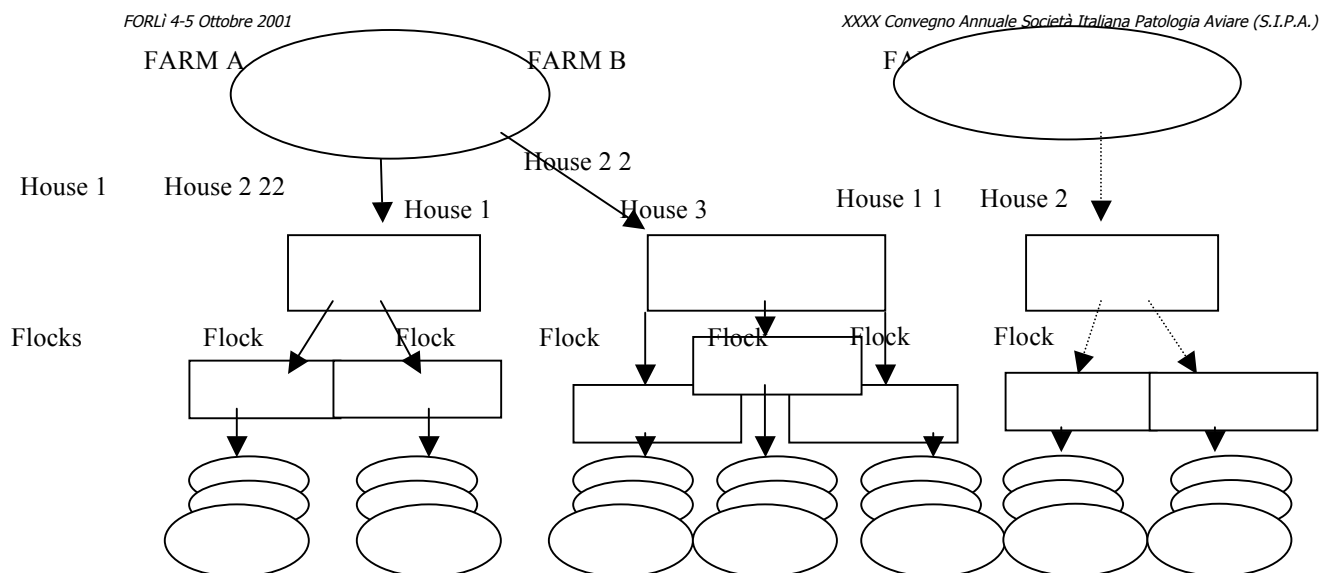
Materiali e Metodi

I dati relativi ai gruppi di broiler accasati nelle aziende danesi, durante il periodo gennaio-Marzo 1998 ed il periodo Gennaio-Settembre 1999, sono stati ricavati da:

- Il data-base Danese ante-mortem: informazioni riguardanti gli incubatoi, identificazione e informazioni riguardanti i gruppi parentali, data di schiusa ecc.
- I rapporti di "condemnation" dai macelli Danesi: informazioni riguardanti i macelli, data di macellazione, numero di animali macellati ecc.
- Proprietari delle aziende di broiler: informazioni riguardanti la data del focolaio di vvIBD
- Veterinari che lavorano per l'industria avicola Danese: informazioni riguardanti quali gruppi di broiler sono stati vaccinati per IBD

I dati contenevano una distinta struttura gerarchica (Figura 2).

Figura 2: La struttura gerarchica dei dati della produzione avicola in funzione dell'incubatoio**Figure 2:** The hierarchical data-structure of poultry production in relation to hatchery



Analisi statistica

Sono stati definiti “casi” quelli in cui gruppi di broiler di età superiore a 2 settimane presentavano una mortalità improvvisa di almeno il 5% dell’effettivo. Inoltre, bisognava che la diagnosi di IBD fosse confermata dal *Danish Veterinary Laboratory* (DVL) sulla base delle lesioni anatomico-patologiche tipiche, delle lesioni istopatologiche della Borsa di Fabrizio (BdF) e della evidenziazione dell’antigene IBD nella BdF mediante test di agar-gel precipitazione (AGP).

In tabella 1 è riportato in maniera sintetica, l’intero set di dati raccolti nel corso del 1998 e 1999 a diversi livelli (*farms, houses e flocks*). Sono state escluse dallo studio le località senza broilers, con informazioni incomplete o non valide o appartenenti agli stessi proprietari. Poiché quello che interessava era l’introduzione di vvIBD nell’azienda di broilers, è stato inserito nell’analisi statistica come “caso” solo il primo gruppo, colpito dal focolaio di vvIBD, in ciascun’azienda. La pratica di macellazione che prevede più invii al macello da un medesimo gruppo viene definita “thinning”.

Tabella 1: Riassunto dei set di dati raccolti nel 1998 e 1999

Table 1. Overview of the content of the full 1998 and 1999 data sets

Anno	Unità	Numero	Numero colpiti da vvIBD	Suunità	Media	Min/max
1998	Farms	79	18	Houses	2.1	1-8
	Houses	218	49	Rotations	1.0	1
	Flocks	218	49	Thinning	1.2	1-4
1999	Farms	299	50	Houses	2.3	1 -16
	Houses	673	81	Rotations	4.4	1- 6
	Flocks	2978	81	Thinning	1.3	1-4

1998

Le aziende di broilers, selezionate come controlli, erano situate nelle provincie di Ringkøbing e Viborg, e non erano state vaccinate verso IBD. Nelle aziende in cui vi erano più *flocks* (houses), un gruppo (house) veniva scelto in maniera random per essere incluso nell’analisi statistica. Sono stati investigati l’associazione tra vvIBD e i fattori di rischio a livello di “farm” (dimensioni, focolai di vvIBD negli anni precedenti), i fattori correlati all’incubatoio (età, identificazione e numero dei gruppi parentali legati alla produzione di un determinato *flock*), i fattori correlati al macello (macellazioni multiple nel medesimo *flock*) e l’alimento. Il set finale dei dati per l’analisi era costituito da 16 casi e 61 controlli *farm/flocks*. L’analisi statistica è stata realizzata usando una regressione logistica ad una variabile (Noordhuizen et al,1997). Si è anche cercato di utilizzare un’analisi multivariabile allo scopo di tenere in considerazione più fattori allo stesso tempo ed evidenziare possibili interazioni. Tuttavia, il numero di casi era limitato, e di conseguenza queste analisi non erano convergenti a causa della estremamente ampia dispersione dei dati in alcuni strati.

1999

Nello studio del 1999 le aziende di broiler selezionate come controllo erano tutte situate nello Jutland e sull’isola di Funen, non erano state vaccinate ed erano situate in un raggio di 30 km dal caso per i quali erano usati come controlli. In aggiunta, almeno un *flock* di età superiore alle due settimane doveva essere presente nel momento di comparsa del corrispondente focolaio di vvIBD; fra tanti *flocks* con tali caratteristiche, veniva selezionato a random un *flock* di controllo. Il set finale dei dati per l’analisi era costituito da 40 casi e 333 controlli *farm/flocks*. Ogni caso aveva tra 2 e 19 controlli negativi.

I fattori di rischio erano raggruppati in tre differenti categorie:

1) Fattori di rischio statici a livello di gruppo

E’ stata esaminata l’associazione tra focolaio vvIBD e fattori che non variano nel tempo a livello di *farm*. I fattori di rischio erano: focolaio di vvIBD nell’azienda negli anni precedenti e numero di “houses” nella azienda.

2) Fattori di rischio tempo dipendenti

E' stata esaminata l'associazione tra focolaio di vvIBD ed un certo evento che si verificava a livello di *farm* o di *flock* entro 6 giorni prima del focolaio di vvIBD. Gli eventi considerati erano, ad esempio, polli spediti dall'incubatoio, parte del gruppo macellato (*thinning*), mangime spedito al gruppo, entro i 6 giorni precedenti il focolaio.

3) Fattori di rischio spazio temporali

Allo scopo di esaminare l'associazione tra tempo, spazio e focolai di vvIBD, sono state create una serie di variabili spazio-temporali. Per ciascuna *farm*, fosse essa caso o controllo, è stato determinato se un focolaio di vvIBD si era verificato all'interno di una distanza di "r" km dalla *farm*, e entro un periodo di "d" giorni prima della data in cui nella *farm* si è verificato il focolaio di vvIBD stesso (casi) o in cui la *farm* è stata appaiata come controllo negativo. Il periodo di tempo "d" variava da 10 a 180 giorni e la distanza "r" da 1 a 15 km. Più grande era il raggio e più lungo era il periodo, tante più *farms* erano interessate da focolai di vvIBD entro la distanza ed il periodo di tempo definito.

Si è deciso di realizzare un'analisi dei fattori di rischio associati con i focolai di vvIBD a livello di *farm* ed in un disegno caso-controllo "nested" (Clayton & Hills, 1993). Poiché quello che interessava era l'introduzione di vvIBD nell'azienda di broilers, è stato inserito nello studio come "caso" solo il primo gruppo, colpito dal focolaio di vvIBD, in ciascun'azienda. Le analisi iniziali avevano suggerito l'elemento geografico come uno dei fattori principali, e quindi si è deciso di accoppiare tutti i casi con controlli negativi situati in un raggio di 30 km. Questo ha portato ad escludere una *farm* "caso" (nessun controllo entro 30 km) e ha fatto sì che il totale delle aziende di broiler, incluse nello studio, fosse 40.

Risultati

1998

Sono state osservate associazioni statisticamente significative tra i 16 casi danesi iniziali di IBD clinica acuta nel 1998 e:

- Certi incubatoi
- Età dei soggetti parentali e
- Un certo tipo di aliemento

Non sono state osservate associazioni tra i casi clinici iniziali di IBD e:

- Macelli
- Numero di macellazioni fatte per ciascun flock
- Casi precedenti di IBD nel 1992
- Numero di *houses* per *farm* o
- Presenza di Salmonella nei gruppi

1999

I risultati hanno indicato la presenza dei seguenti fattori associati con i focolai di vvIBD

- Precedente focolaio entro 7 km e 10 giorni
- Precedente focolaio entro 14 km e 5 mesi
- Parte del *flock* macellato (*thinning*) dal macello X entro i 6 giorni precedenti il focolaio
- Gruppo di macelli A, B e C

Con analisi multifattoriale non sono state osservate associazioni tra i casi clinici iniziali di IBD e:

- Certi incubatoi
- Certi mangimi
- Invio del mangime ai gruppi entro 6 giorni precedenti il focolaio
- Il verificarsi di un focolaio precedente di vvIBD nella stessa *farm* (nel 1992 o nel 1998).

Discussione

Le analisi statistiche hanno indicato l'incubatoio come un fattore di rischio per l'introduzione della forma acuta di IBD in Danimarca nel 1998. I fattori di rischio significativi correlati all'incubatoio tendevano ad identificare delle circostanze che rendevano i polli suscettibili alla IBD clinica, quali, ad esempio, gruppi parentali immunosoppressi o vaccinati in modo insufficiente, piuttosto che suggerire una specifica sorgente d'infezione. L'associazione tra IBD clinica e mangime potrebbe essere correlata ad una causa di infezione, forse originata da uccelli selvatici o dall'alimento stesso.

L'associazione tra un focolaio di vvIBD nel 1999 ed un focolaio di vvIBD entro i 10 giorni precedenti in un'azienda situata all'interno di un'area di 7 km di raggio, indica una diffusione a livello locale della vvIBD. Una possibile spiegazione di ciò potrebbe essere che il virus si sia diffuso a partire dalla lettiera accumulata o dispersa all'esterno delle aziende infette e da qui a gruppi di broiler recettivi tramite uccelli selvatici, roditori o con il vento. Contrariamente al macello X, l'associazione tra il gruppo di macelli A, B e C e il focolaio di vvIBD non era dovuta al *thinning*.

Bibliografia

1. Clayton & M. Hills: Statistical Models in Epidemiology, Oxford Science Publications, 1993.
2. Noordhuizen, J. P. T. M., Frankena, K., van der Hoofd, C. M. and Graat, E. A. M., 1997. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. Wageningen Pers.
3. Van den Berg, T, Eterradossi, N., Toquin, D., Meulemans, G. (2000). Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease). *Revue Scientifique et Technique*, 19(2): 527-543. Office International des Epizooties, Paris, France.

RELAZIONE 3**INFLUENZA AVIARE (H7N1) IN ITALIA: SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA E STRATEGIE DI CONTROLLO****S. Marangon, M. Bettio, L. Bortolotti, N. Ferrè, C. Terregino¹, M. Dalla Pozza***Centro Regionale di Epidemiologia Veterinaria del Veneto; ¹Centro di Referenza Nazionale per l'Influenza Aviaria e per la Malattia di Newcastle - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD).*

Parole chiave: Influenza aviaria, epidemiologia, vaccinazione

Avian Influenza (H7N1) in Italy: epidemiological situation and control strategies

Key words: Avian influenza, epidemiology, vaccination

Summary: In 1999-2000 Italy experienced the most devastating avian influenza (AI) epidemic ever recorded in Europe. From 17 December 1999 to 5 April 2000, 413 AI outbreaks, mainly located in densely populated poultry areas in Veneto and Lombardia regions, were detected. The epidemic was related to the previous spread among poultry farms in the same Regions of a low pathogenic avian influenza (LPAI) virus (subtype H7N1), which eventually became virulent by mutation with the emergence of a highly pathogenic strain (HPAI). After the eradication of the HPAI virus and the restocking of poultry farms, the presence of the LPAI strain was detected again in the southern area in Verona province. From 14 August to 25 November 2000, 57 infected farms, mainly located in the above-mentioned province, were identified. The reappearance of the LPAI virus in an area with a high concentration of poultry farms and the possible mutation of the LPAI strain to a new HPAI virus, required the implementation of an emergency vaccination programme against the disease in a limited territorial area to supplement disease control measures already in force. The programme has been approved by the Commission and adequate restriction measures have been enforced (Commission Decision 2000/721/EC as amended). Shortly after the beginning of the vaccination plan, LPAI affected poultry farms mainly located in a limited area in Padova province were identified. This last epidemic due to H7N1 LPAI virus lasted from 21 December 2000 to 20 March 2001, with the spread of the infection to three meat-type turkey farms located in the vaccination area. The last LPAI outbreak in the vaccination area was detected on 5 January 2001 and it was the only one vaccinated flock involved in the epidemic. The virus did not spread to other vaccinated farms located close to the outbreak sites as shown by the results of the surveillance activities immediately set up by the local veterinary services.

Corrispondente: Stefano Marangon, Centro Regionale di Epidemiologia Veterinaria del Veneto, Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Via Romea 14/A, 35020 Legnaro (PD) Tel. +39 0498084255, Fax. +39 049 8830268 email: stefano.marangon@regione.veneto.it

Premessa

Dal mese di marzo del 1999 gli allevamenti avicoli di Veneto e Lombardia e, in particolare, le aziende di tacchini da carne e di ovaiole, sono state interessate dalla più grave epidemia di influenza aviaria mai manifestatasi in Europa. L'epidemia è stata generata dalla circolazione, per circa dieci mesi, di un virus influenzale a bassa virulenza (LPAI) appartenente al sottotipo H7N1, che è successivamente mutato dando origine ad uno stipite ad alta virulenza (HPAI). In Veneto, dal 17 dicembre 1999 al 20 marzo 2000, sono stati individuati 158 focolai di infezione, su un totale di 413 focolai notificati in Italia, per la maggior parte (117 focolai) localizzati in un'area ad elevata densità zootecnica della provincia di Verona. In Italia, più di 16 milioni di volatili domestici sono venuti a morte o sono stati abbattuti e distrutti al fine di eradicare l'infezione, con un danno economico diretto pari a oltre 200 miliardi di lire (Capua & Marangon, 2000).

Focolai da virus a bassa patogenicità 2000-2001

Dopo la ripresa dell'attività produttiva, in data 14 agosto 2000, è stato notificato un sospetto di infezione da virus LPAI in un allevamento di tacchini da carne del comune di Roverchiara (VR). Il virus è stato isolato il 16 agosto e successivamente tipizzato come stipite a bassa virulenza appartenente al sottotipo H7N1. Lo stamping out o la macellazione in condizioni di sicurezza dei gruppi infetti e la pronta adozione di rigorose misure restrittive nelle aree territoriali circostanti i focolai, se da un lato hanno consentito di circoscrivere la diffusione dell'infezione, dall'altro non hanno evitato la trasmissione del contagio tra allevamenti contigui o collegati funzionalmente (Figura 1). Dal 14 agosto al 24 novembre 2000, 57 allevamenti, di cui 53 di tacchini da carne e 4 di quaglie, sono stati interessati dall'infezione.

Tabella 1: Epidemia di LPAI in Veneto (2000-2001): distribuzione e consistenza degli allevamenti infetti**Table 1:** LPAI epidemic in Veneto (2000-2001): distribution and size of affected farms

Comune	Focolai		N° animali
	N° allevamenti		
	Ovaiole	Tacchini da carne	
Cologna Veneta		3*	36,500
Poiana Maggiore		1^	10,000
Este		4	52,250
Ospedaletto Euganeo	1	10	144,650
Ponso		2	27,500
Saletto		1	7,000
Sant'Elena		1	5,800
Totale	1	22	283,700[§]

*1 allevamento vaccinato;

^Tacchini da riproduzione;

§130.200 capi avviati alla macellazione

N. 1 allevamento di 7.000 galletti abbattuto preventivamente

Tuttavia, il 21 dicembre 2000 la presenza del virus LPAI è stata segnalata in un allevamento di tacchini da carne non vaccinato, prossimo alla macellazione, del comune di Cologna Veneta (area di vaccinazione) e, in data 28 dicembre 2001, in due allevamenti del comune di Opedaletto Euganeo (PD), aree territoriali precedentemente non coinvolte nell'epidemia da virus LPAI. In totale, dal 21 dicembre 2000 al 20 marzo 2001, sono stati notificati 23 focolai, tutti causati da virus LPAI, di cui la maggior parte localizzati in un'area limitata della provincia di Padova, con coinvolgimento anche di 3 allevamenti di tacchini da carne situati nella zona di vaccinazione (Figura. 2 e Tabella 1).

Un unico focolaio di infezione di LPAI è stato individuato, in data 5 gennaio 2001, in un allevamento di tacchini da carne vaccinato, posto nelle immediate vicinanze (circa 200 metri) di un'azienda di tacchini, non sottoposti a vaccinazione, precedentemente colpita dalla malattia (Tabella 2). Il virus non si è però diffuso ad altri allevamenti di tacchini vaccinati posti in vicinanza (da 800 metri a 1 km) ai focolai di LPAI (Figura 3), come evidenziato dai risultati delle attività di monitoraggio sia sierologico, sia virologico effettuate in tali allevamenti e in tutta l'area di vaccinazione secondo le modalità e con le cadenze previste dal piano di vaccinazione.

Piano di vaccinazione in provincia di Verona

La ricomparsa del virus LPAI in provincia di Verona, sette mesi dopo l'ultimo isolamento di tale stipite in Italia, in un'area caratterizzata da un'elevata densità di allevamenti di specie sensibili, ha reso opportuna la messa in atto di tutti gli interventi necessari per limitare la diffusione dell'infezione, associando alle misure di eradicazione l'impiego della vaccinazione. Prove sperimentali effettuate presso il Centro di Referenza Nazionale hanno infatti evidenziato che la profilassi immunizzante con vaccino inattivato specifico nei confronti dell'emoagglutinina H7 consente di proteggere gli animali dalla forma clinica della malattia e di ridurre, nel contempo, il livello di escrezione virale. In condizioni di campo ciò può consentire una diminuzione della carica virale nell'allevamento infetto e di conseguenza il livello di contaminazione ambientale, con riduzione del rischio di diffusione del contagio. Il piano di vaccinazione di emergenza nei confronti dell'influenza è stato approvato dalla Commissione Europea con Decisione 2000/721/CE (Anonimo, 2000a), modificata dalla Decisione 2000/785/CE (Anonimo, 2000b), ed è stato avviato, a partire dal 15 novembre 2000, in un'area circoscritta della provincia di Verona (Tabella 2 e Figura 4), caratterizzata da un'elevata densità di allevamenti avicoli.

Tabella 2: Area di vaccinazione: consistenza degli allevamenti avicoli

Table 2: Vaccinated area and size of farms

Specie	N° allevamenti	N° animali
Tacchini carne	310	5.009.100
Ovaiole	14	608.400
Broiler	199	7.220.600
Riproduttori tacchini	2	35.000
Selvaggina	12	80.500
Faraone	20	1.015.000
Riproduttori broiler	9	97.400
Quaglie	6	1.127.000

Il piano approvato dalla Commissione (Anonimo, 2000c) è così articolato:

- deve essere utilizzato un vaccino inattivato di tipo eterologo (sottotipo H7N3) che consente sia di ridurre gravità della malattia e il rischio di diffusione del virus sia, una volta messo a punto e validato un test discriminatorio, la distinzione degli animali infetti dai vaccinati non infetti. In particolare il vaccino è preparato utilizzando il ceppo A/pollo/Pakistan/95 (H7N3);
- la profilassi immunizzante obbligatoria sia effettuata in tutti gli allevamenti di tacchini da carne, per due/tre cicli produttivi consecutivi in relazione al sesso degli animali accasati, e negli allevamenti di ovaiole per la produzione di uova da consumo, che applicano il tutto pieno/tutto vuoto a livello aziendale, per la durata di un unico ciclo produttivo. Devono, inoltre, essere sottoposti a vaccinazione obbligatoria gli allevamenti di galli golden, galletti livornesi e capponi;
- gli allevamenti di altre specie e tipologie non devono essere sottoposti alla vaccinazione;
- i Servizi veterinari competenti per territorio autorizzano l'accasamento di volatili esclusivamente negli allevamenti che soddisfano precisi requisiti strutturali, igienico-sanitari e manageriali e nel rispetto delle regole definite dal piano di vaccinazione;
- il piano è iniziato il 15.11.2000 e troverà attuazione almeno fino al 15.05.2002;
- negli allevamenti interessati devono essere vaccinati tutti i soggetti dell'allevamento, ad eccezione di un numero definito di animali sentinella. Il numero di animali sentinella per allevamento deve essere pari almeno all'1% dell'effettivo e, in ogni caso, non inferiore a 100 soggetti. In ogni capannone devono essere presenti almeno 50 sentinelle;
- devono essere obbligatoriamente applicati gli schemi vaccinali definiti nel piano di vaccinazione;
- devono essere effettuati specifici piani di monitoraggio per la verifica dell'efficacia dei programmi di vaccinazione e piani di sorveglianza per valutare l'evoluzione della situazione epidemiologica. Questi ultimi devono essere basati, negli allevamenti vaccinati, sul controllo sierologico delle sentinelle. In tutti gli allevamenti non vaccinati devono essere adottate le misure di controllo ed effettuate le azioni di monitoraggio previste dal piano;
- devono essere applicate misure restrittive alla movimentazione di volatili da e verso le aree sottoposte al programma di vaccinazione.

Figura 1: Epidemia di LPAI in provincia di Verona nel 2000: distribuzione territoriale dei focolai
Figure 1: LPAI epidemic in Verona province during 2000 areal ditribution of outbreaks

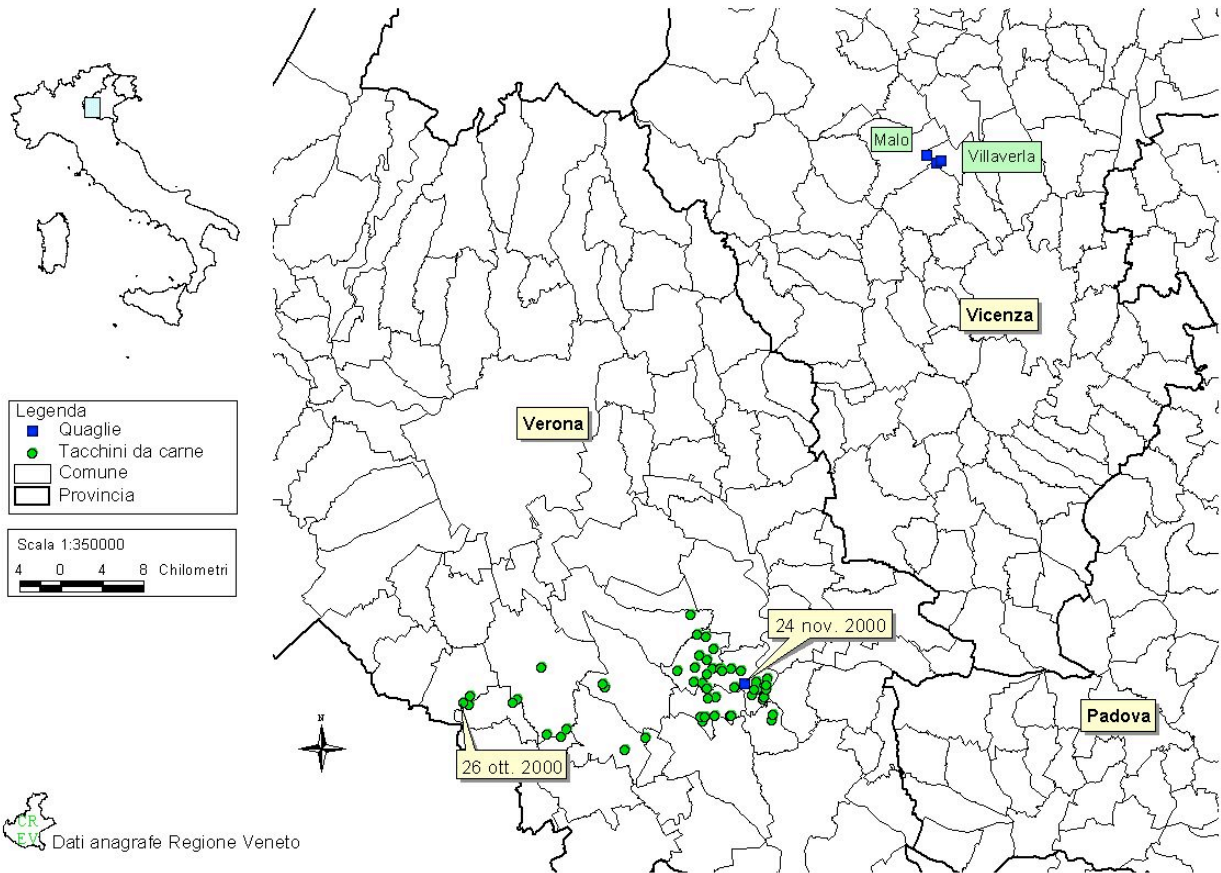


Figura 2: Epidemia di LPAI in Veneto (2000-2001): distribuzione territoriale dei focolai
Figure 2: LPAI epidemic in veneto during 2001-2001: areal distribution of outbreaks

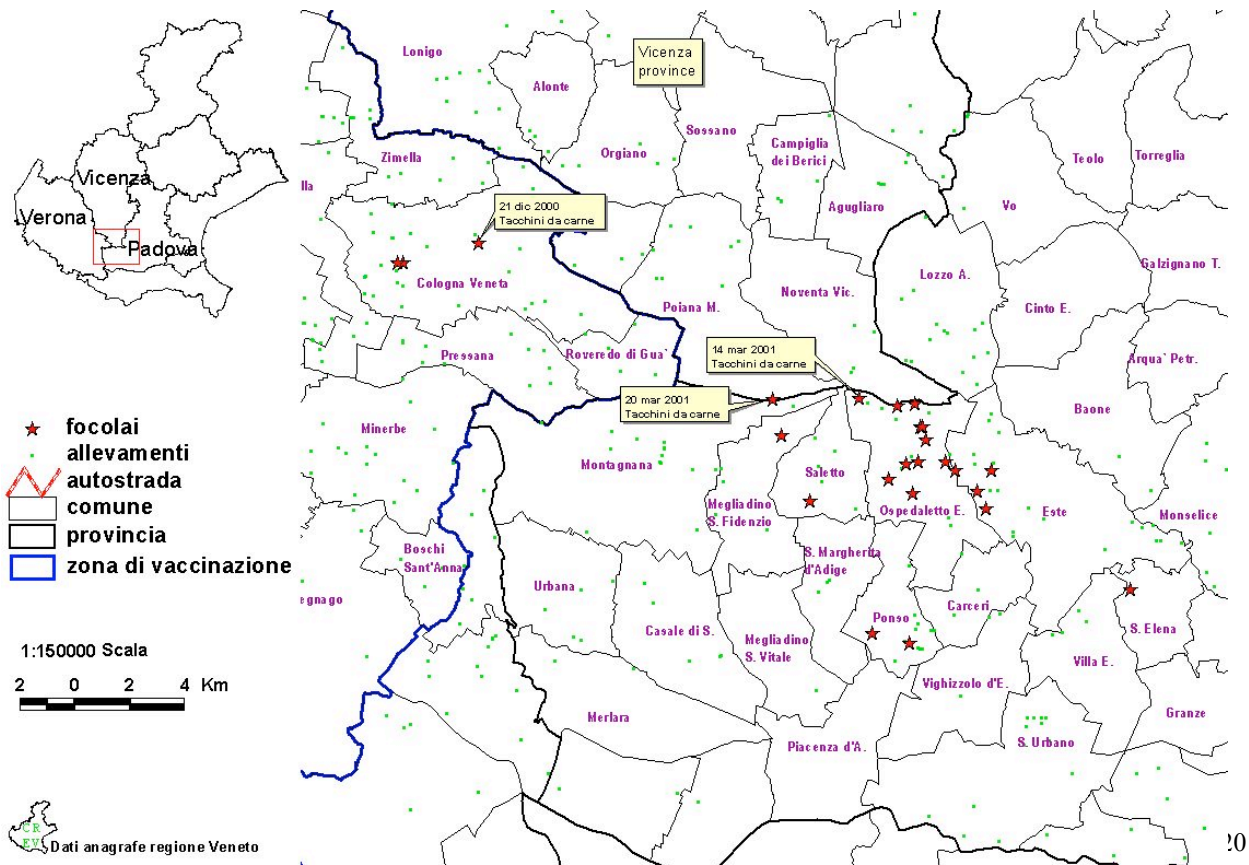


Figura 3: Epidemia di LPAI in Veneto (2000-2001): distribuzione territoriale degli allevamenti nell'area di vaccinazione

Figure 3: LPAI epidemic in Veneto (2000-2001) areal distribution of farms in the vaccinated area

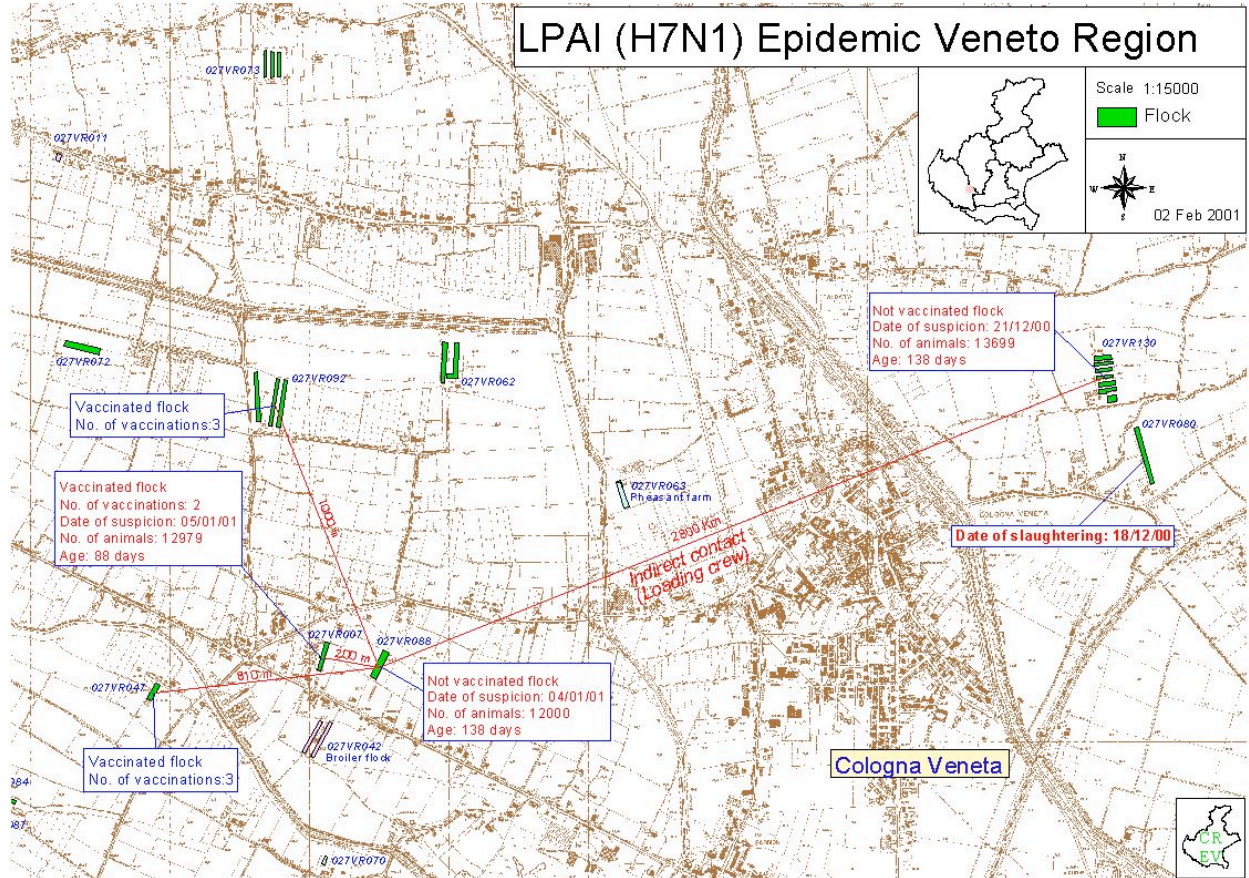
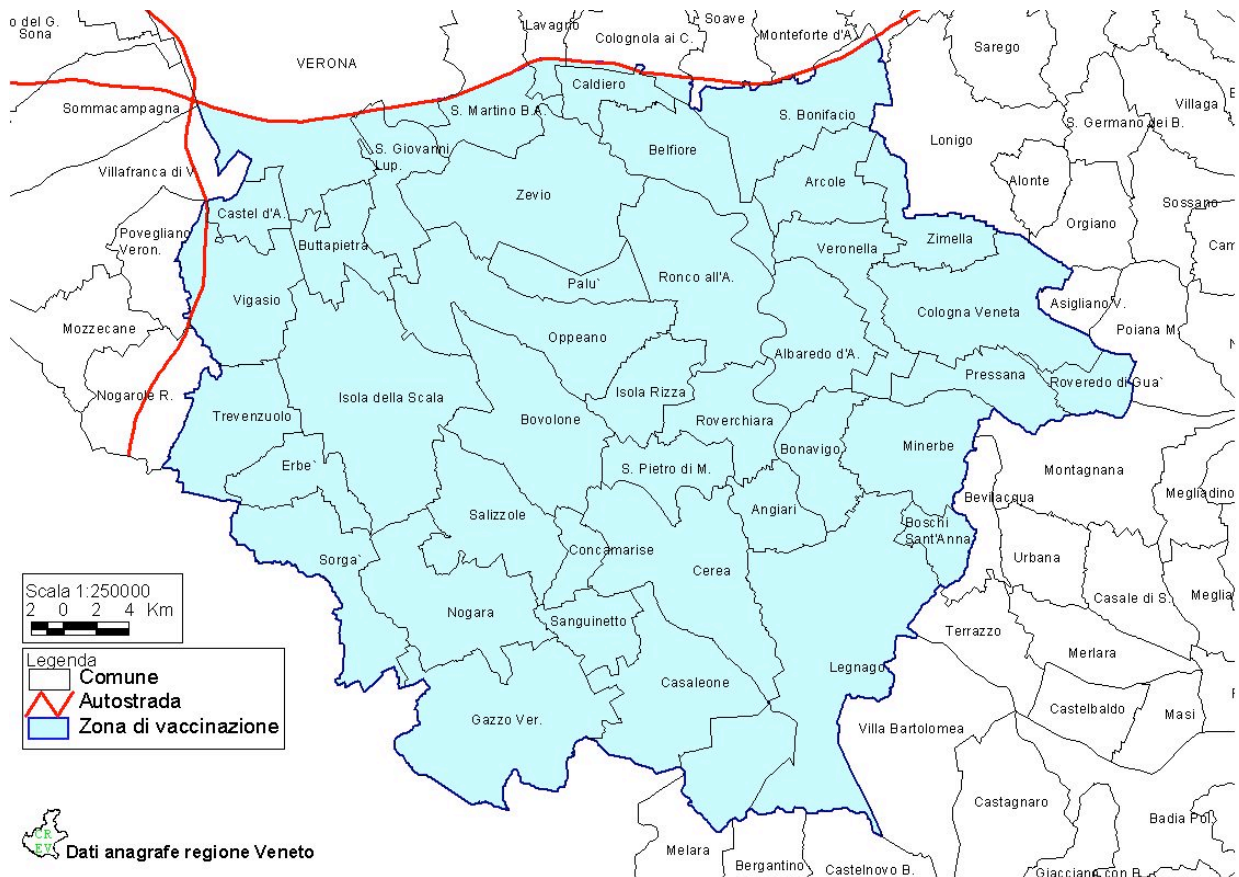


Figura 4: Area di vaccinazione

Figure 4: Vaccinated area



In tabella 3 sono riassunti i risultati del piano di monitoraggio effettuato per verificare l'efficacia del programma vaccinale, che si basa sull'esecuzione di esami sierologici in almeno 30 allevamenti sottoposti a profilassi immunizzante. Ciò al fine di garantire l'individuazione di almeno un gruppo non immunizzato se la prevalenza di tali aziende è $\geq 10\%$, con un livello di confidenza del 95%. In ogni allevamento sono stati sottoposti a prelievo di sangue almeno 10 volatili (probabilità del 95% di individuare almeno un soggetto positivo se la prevalenza della sieropositività è $\geq 30\%$), selezionati casualmente fra gli animali presenti nelle diverse unità produttive.

Tabella 3: Titoli sierologici nei tacchini da carne vaccinati valutati tramite prova di inibizione dell'emoagglutinazione

Table 3: HI titres in vaccinated meat turkeys

N° vaccinazioni	N°	Reciproco del titolo			GMT [^]	Rapporto campioni positivi*/testati (%)
		Mediana	Min	Max		
1	35	8	4	32	8,00	14,00
2	274	16	4	256	13,55	78,29
3	314	16	4	512	22,16	86,98
4	260	32	4	512	29,24	97,01

[^] Media geometrica del titolo; * Titolo $\geq 1:4$

I dati in tabella 4 si riferiscono ai risultati degli esami sierologici per influenza eseguiti dal 15 novembre 2000 al 31 maggio 2001, per evidenziare precocemente l'eventuale circolazione dello stipite virale, sottotipo H7N1, negli allevamenti vaccinati. In tutti gli allevamenti vaccinati sono stati prelevati, dal veterinario ufficiale, 10 campioni di sangue (probabilità del 95% di individuare almeno un soggetto positivo se la prevalenza della sieropositività è $\geq 30\%$) dalle sentinelle non vaccinate, con cadenza almeno mensile.

Tabella 4: Esiti sierologici monitoraggio allevamenti vaccinati (sentinelle)

Table 4: Serological results in monitored vaccinated farms (sentinels)

Esito	ASL	N° controlli sierologici per specie			Totale campioni
		Ovaiole	Tacchini da carne	Totale	
N	20	10	242	252	2.562
	21	8	411	419	4.468
	22	5	179	184	1.880
P		-	-	-	-
Totale		23	832	855	8.910

N = Negativi; P = Positivi

I dati riportati in tabella 5 riassumono i risultati degli esami sierologici per il sottotipo H7 del virus influenzale effettuati negli allevamenti non vaccinati della zona in oggetto. Analoghi risultati sono stati ottenuti nel corso del monitoraggio eseguito negli allevamenti avicoli del Veneto situati al di fuori dell'area di vaccinazione, dopo l'eradicazione dell'ultimo focolaio di infezione da virus LPAI in provincia di Vicenza (Anonimo, 2001a). Appare quindi evidente l'assenza di una circolazione del virus influenzale negli allevamenti avicoli situati sia nell'area di vaccinazione, sia al di fuori di detta area. Tali conclusioni sono state recepite dalla Commissione Europea che con Decisione 2001/627/CE (Anonimo, 2001b) ha ridotto le misure restrittive applicate in precedenza alla commercializzazione di volatili vivi e loro prodotti provenienti dalla zona vaccinale.

Tabella 5: Esiti sierologici monitoraggio allevamenti non vaccinati

Table 5: Serological results in non vaccinated farms

Esito	ASL	N° controlli sierologici per specie								Totale campioni	
		Broiler	Fagiani	Faraone	Ovaiole	Poll. riprod.	Quaglie	Tacchini riprod.	Altre specie		Totale
N	20	144	4	12	5	36	6	-	4	211	2.220
	21	290	21	32	23	36	15	11	1	429	5.029
	22	93	-	6	27	-	-	-	-	126	1.259
P		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Totale		527	25	50	55	72	21	11	5	766	8.508

N = Negativi; P = Positivi

Conclusioni

La circolazione del virus LPAI negli allevamenti avicoli ha comportato un elevato rischio di mutazione dello stipite a bassa virulenza con possibile comparsa, come già verificatosi nel 1999, dello stipite HPAI, evento che avrebbe comportato conseguenze catastrofiche per l'intero settore avicolo nazionale.

La ricomparsa e l'attiva circolazione del virus LPAI dopo l'eradicazione dello stipite HPAI può essere correlata alle caratteristiche biologiche del virus (largo spettro d'ospite, persistenza nell'ambiente, scarso potere patogeno con possibile insorgenza di infezioni asintomatiche, ecc.), alla persistenza dell'infezione in aree ad elevata densità di

allevamenti avicoli con presenza contemporanea di numerose specie sensibili, alle caratteristiche organizzative e strutturali dell'industria avicola (strette connessioni funzionali fra gli allevamenti, elevato numero di contatti a rischio, incostante applicazione delle necessarie misure di biosicurezza, ecc.). Si deve, inoltre, rilevare la difficoltà di applicare rigorose misure restrittive sulle movimentazioni di volatili e loro prodotti, che penalizzano l'attività dei produttori avicoli, in assenza di precise basi normative.

La situazione sopra illustrata ha reso evidente la necessità di adottare piani di intervento straordinari, al fine di evitare il verificarsi di una nuova epidemia da virus ad alta virulenza. Inoltre, a medio termine, è indispensabile che, accanto agli interventi promossi o messi in atto dal Servizio veterinario, sia in fase ordinaria che in situazione di emergenza, le competenti Autorità centrali provvedano a modificare la vigente normativa europea in materia e adottino le necessarie linee di indirizzo per il rafforzamento delle misure di prevenzione negli allevamenti avicoli.

Bibliografia

1. Anonimo (2000a). Gazzetta Ufficiale CE (18 novembre 2000) L291 33
2. Anonimo (2000b). Gazzetta Ufficiale CE (18 dicembre 2000) L311 49
3. Anonimo (2000c). Information from Italy on the request to vaccinate against avian influenza in certain parts of Italy (Region of Veneto). CEC, Doc. SANCO/2695/2000 – Rev.1. p. 25
4. Anonimo (2001a). Low pathogenic avian influenza in Italy. Report on the implementation of the emergency vaccination programme in the province of Verona (15.11.2000 – 31.05.2001). p. 88
5. Anonimo (2001b). Gazzetta Ufficiale CE (31 luglio 2001) L217 16
6. Capua, I., Marangon, S. (2000). The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. Avian Pathology, 29, 289-294.

RELAZIONE 4**L'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN CORSO DI MALATTIE EMERGENTI DI ORIGINE
SCONOSCIUTA: L'INSEGNAMENTO TRATTO DALL'EPIDEMIA DI POULT ENTERITIS
MORTALITY SYNDROME (PEMS) DEL TACCHINO IN NORTH CAROLINA****J.P. Vaillancourt (DVM, MSc, PhD), H.J. Barnes (DVM, PhD)***Department of Farm Animal Health & Resource Management, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University,
Raleigh, North Carolina, USA*

Parole chiave: malattie emergenti e re-emergenti, piani di sorveglianza, epidemiologia, tacchini, PEMS

**Epidemiological Challenges Associated with Emerging Diseases of Unknown Origin: Lessons Learned
from the Poultry Enteritis Mortality Syndrome Epidemic in North Carolina***Key words: emerging e re-emerging diseases, surveillance programs, epidemiology, turkeys, PEMS*

Correspondence: J.P. Vaillancourt Department of Farm Animal Health & Resource Management, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA. Email: jp_vaillancourt@ncsu.edu

Introduzione

Le malattie emergenti e re-emergenti del pollame rappresentano un pericolo costante per l'economia delle comunità rurali. Tali malattie sono in grado di ridurre la competitività globale dei prodotti agricoli (aumento dei costi di produzione, possibili blocco degli scambi), hanno un effetto negativo sull'ambiente ed un impatto negativo sulle comunità agricole disturbando in qualche modo le attività imprenditoriali e gli investimenti.

Non si può certo dire che esse stiano scomparendo ed anzi, a differenza di quanto avviene per le malattie emergenti dell'uomo, non sembra esistere un approccio investigativo sistematico e completo per identificare rapidamente e fronteggiare un aumento dell'incidenza delle malattie del pollame.

All'inizio degli anni '90 l'industria del tacchino in Nord Carolina si è trovata a dover fronteggiare quella che appariva una nuova, virulenta, malattia enterica. Inizialmente descritta con il nome "*spiking mortality*" è oggi universalmente conosciuta come "*poultry enteritis mortality syndrome*" o PEMS. Immediatamente dopo aver riconosciuto l'esistenza del problema, l'industria avicola del tacchino costituì, nel 1992, la *Turkey Mortality Task Force* allo scopo di organizzare e coordinare le ricerche sulla nuova malattia, ed in prima luogo fu avviato lo studio delle cause e la definizione dei metodi di prevenzione e controllo. Di fatto, sebbene siano trascorsi più di 10 anni dalla sua comparsa, alcuni aspetti rimangono ancora oscuri. La malattia non ha più i caratteri devastanti che presentò al suo esordio ma è ancora presente in forma endemica. Che cosa abbiamo imparato durante questi anni vissuti a combattere la malattia, che ci potrà essere utile in futuro? Questa relazione non ha lo scopo di fornire una risposta esaustiva e condivisa da parte di tutti coloro che sono stati coinvolti nelle ricerche sulla PEMS in questi anni, ma ha tuttavia la prerogativa di portare all'attenzione le problematiche chiave su cui discutere, se si vuole identificare e combattere le malattie emergenti e re-emergenti con maggiore efficacia. Molte di queste problematiche riguardano l'epidemiologia di tali condizioni.

Situazione di campo

Tanto più tempo si impiega a determinare e pubblicizzare la presenza di una nuova situazione sul territorio, tanto più tempo serve per controllarla. La sorveglianza sulle malattie del pollo negli Stati Uniti è principalmente effettuata a livello di compagnie produttrici. I principali gruppi integrati spesso dispongono di un proprio staff veterinario e di un laboratorio nel quale sono condotti i test diagnostici di routine. Inoltre, possono anche ricorrere in modo consistente alle prestazioni del network costituito dai laboratori statali. La struttura statale funziona bene se le informazioni fornite da ciascuna compagnia sono velocemente trasmesse agli altri gruppi presenti nella stessa zona. Questo si verifica, ad esempio, quando in una regione sono identificate malattie ben note e denunciabili come la laringotracheite infettiva e la micoplasmosi da (*Mycoplasma gallisepticum*). Tuttavia, raramente questo sistema funziona quando compare una nuova malattia, in quanto non sono disponibili test diagnostici di riferimento e, stante la natura competitiva delle compagnie produttrici, nessuno è particolarmente incline a denunciare segni clinici non definiti, lesioni o scarse performances produttive.

Per fronteggiare con efficacia situazioni conosciute e nuove sono necessari dei programmi di sorveglianza, ma questi, sono raramente considerati utili se non quando è troppo tardi; questi programmi sono anche considerati troppo onerosi in termini di costi, quanto tutto va bene. Inoltre, le industrie avicole, con i loro margini di profitto molto bassi, tendono a mantenere efficienti solo quei servizi che sono considerati essenziali su base continua. Secondi molti dirigenti dei gruppi produttori, un sistema regionale di sorveglianza alle malattie non soddisfa questo criterio. Per tale motivo bisognerà operare dei cambiamenti su tale sistema se si vorrà definire in maniera soddisfacente il contesto epidemiologico associato con le malattie emergenti.

I principali elementi sono: definizione della malattia, monitoraggio "on-farm", coordinamento dei risultati provenienti da più parti, disseminazione delle informazioni a tutte le componenti interessate, e implementazione delle misure di controllo. Ciascuno di questi capitoli è di seguito illustrato brevemente.

Definizione della malattia

Questo è un aspetto assolutamente critico quando non sono disponibili test diagnostici di riferimento. La definizione deve essere chiara e semplice. La cosa migliore è produrre al più presto una definizione utile dal

punto di vista pratico, in quanto ciò apre la strada alla realizzazione di un piano di sorveglianza. Questo è un fatto vitale in quanto all'esordio di ogni epidemia, la natura della malattia (infettiva o meno) solitamente non è conosciuta. Non è necessario che la definizione sia perfetta ma è importante che venga conosciuto e applicato da chiunque è coinvolto nella gestione dell'epidemia. E' necessario che presenti un'alta sensibilità al fine di identificare tutti i casi (è meglio avere, infatti, dei falsi positivi che dei falsi negativi). Per esempio la PEMS è definita clinicamente sulla base delle caratteristiche di mortalità nei tacchinotti di 7-28 giorni di età in assenza di cause note. Sono riconosciute due forme cliniche: la "spiking mortality dei tacchini (SMT)" e la "excess mortality dei tacchini (EMT)". Nei casi gravi di SMT la mortalità si assesta su livelli pari o superiori a 1%/die per almeno tre giorni consecutivi e/o 9% tra 7 e 28 giorni di età. Una mortalità superiore al 2% ma inferiore al 9% tra 7 e 28 giorni di età, ma che non è uguale o supera l'1%/die per 3 giorni consecutivi corrisponde e definisce la EMT ovvero la forma più blanda della malattia. Sebbene si tratti di una definizione piuttosto vaga si è visto che funziona poiché comprende le caratteristiche cliniche che sono state costantemente riscontrate in tutti i casi di PEMS.

Potenzialità diagnostiche

Coloro i quali conducono le indagini epidemiologiche devono poter disporre dei risultati provenienti da tutti i laboratori presenti nel territorio/i coinvolto/i. Ciò implica necessariamente che vi siano laboratori adeguati in termini di risorse umane e strumentali e di conoscenze tecniche. Se le industrie devono disporre di laboratori per le analisi di routine, i laboratori statali devono viceversa essere in grado di eseguire analisi per tutte le malattie della lista A e B dell'OIE (vedi www.oie.int) e per quelle malattie infettive presenti in forma endemica nelle regioni di loro competenza. Nel Nord America esiste anche un buon network di laboratori di riferimento (laboratori federali e universitari) in grado di fornire degli standard di riferimento (*gold standard*) per specifici test e, se necessario, di eseguire ulteriori indagini. Questi laboratori hanno un ruolo chiave nell'aiutare i ricercatori a trovare risposta ad alcune loro domande, o nel permettere loro di porne di migliori. Possono inoltre rappresentare una preziosa risorsa quando i diversi laboratori regionali forniscono delle risposte contraddittorie.

Monitoraggio on-farm

Verifica della relativa importanza degli agenti patogeni

Di solito, quando si verificano dei nuovi casi di malattia si procede all'acquisizione, nel caso fossero necessari, di una gran quantità di materiali da esaminare e di dati (sieri, tessuti, dati di produzione e sanitari ecc.) Tuttavia, la cosa migliore sarebbe "impostare" uno studio caso-controllo, all'interno del più ampio contesto di indagini da realizzare. Poiché le risorse umane, strutturali ed economiche sono spesso limitate, è più efficace focalizzare l'attenzione su un relativamente piccolo numero di casi tipici, comparandoli ad altri gruppi simili per regione, tipo di produzione ed età dei soggetti a rischio. I materiali raccolti da tutte queste aziende dovranno poi essere esaminati contestualmente, ricorrendo agli strumenti diagnostici disponibili. E' inoltre importante prelevare e conservare un sufficiente numero di campioni e materiali, che potranno essere utili per future indagini (ad esempio allorché si rendano disponibili o siano sviluppati nuovi test diagnostici). Soggetti sentinella possono essere introdotti per ottenere dei campioni qualitativi nel corso delle indagini per l'identificazione di patogeni.

Sentinelle

La prima priorità è sempre determinare la natura della malattia. E' contagiosa? L'impiego di soggetti sentinella è un valido strumento epidemiologico per rispondere a questa domanda. Le sentinelle consentono un'esposizione alle condizioni di campo per un periodo determinato. Possono essere collocate con diverse modalità: contatto diretto con animali ammalati, nella stessa stanza ma non a contatto diretto (ad esempio in una gabbia sospesa), non in contatto diretto e protetti da insetti (ad esempio sospesi in una gabbia coperta con un telo o zanzariera che impedisce l'ingresso di mosche, zanzare ecc). Naturalmente possono anche essere utilizzate per determinare se materiali quali la lettiera sporca possono essere infettivi. Per esempio, sentinelle poste in gruppi affetti da PEMS hanno sviluppato la malattia. La malattia è anche stata riprodotta in sentinelle suscettibili somministrando loro nell'alimento le feci o le sospensioni intestinali di uccelli malati, le larve di scarafaggi prelevati in capannoni dove vi erano animali malati ed esponendoli alla lettiera di gruppi infetti. Il lavoro effettuato con le sentinelle poste su lettiera usata ha permesso di determinare che questa rimane infetta per non più di tre settimane dopo l'allontanamento degli uccelli. La riproduzione della malattia in soggetti sentinella permette inoltre la raccolta di campioni "precoci", che sono ideali per l'isolamento e di campioni "consecutivi o sequenziali", che risultano estremamente utili per la definizione della patogenesi della malattia.

Le indagini sulla PEMS hanno portato a definire un'etiologia infettiva multipla senza che vi fosse un singolo agente responsabile di tutti i casi. Gli studi di campo e di laboratorio hanno confermato la presenza di numerosi agenti in grado di infettare i tacchinotti durante il primo mese di vita (Tabella 1). Il problema è chiarire il ruolo che ciascuno di essi riveste, singolarmente e in associazione ad altri patogeni. Per ottenere questi dati sono necessari esperimenti controllati. Gli studi epidemiologici sono anche in grado di svelare l'importanza di questi agenti in campo. Per esempio, il coronavirus del tacchino è un noto patogeno negli USA e la sua attitudine a causare una patologia enterica è da tempo ben nota. I primi risultati di campo provenienti dalla parte occidentale della Carolina del Nord suggerivano che tale virus aveva iniziato a mostrare un'elevata prevalenza nel momento in cui l'incidenza della PEMS stava aumentando (Tabella 2). Al contrario nella parte orientale dello stato la PEMS non risultava essere un problema grave ed al tempo stesso anche il coronavirus non era altrettanto prevalente. Ma una volta che i risultati per PEMS e coronavirus erano confrontati per lo stesso gruppo e per regione, diventò evidente che il coronavirus non era strettamente associato con la PEMS (Tabella 3). E' oggi universalmente riconosciuto che la gravità della malattia aumenta quando è presente il coronavirus, ma che il coronavirus non può essere considerato l'agente eziologico primario della PEMS.

Tabella 1: Agenti infettivi associati con il complesso "poult enteric disease" (adattato da Barnes et al., 2000)

Table 1: Infectious agents associated with poult enteric disease complex (adapted from Barnes et al., 2000)

Virus	Batteri
Aviadenovirus ^(a)	Campylobacter
Alphavirus ^(b)	Clostridium
Astrovirus	Enterococcus
Coronavirus	Escherichia coli
Enterovirus ^(c)	LSFOs ^(f)
Parvovirus-like	Salmonella
Picornavirus-like ^(d)	Protozoi
Orthoreovirus	Cochlosoma
Rotavirus ^(e)	Cryptosporidium
Torovirus	Eimeria
Small round viruses non classificati	Spironucleus ^(g)
	Trichomonas
Funghi	
Candida	

a) Virus del gruppo 1 e 2 sono comuni nei tacchini al disotto di 5 settimane di età

b) Eastern equine encephalitis e Highlands J viruses

c) Almeno due sierotipi distinti

d) Incluso 'pseudopicornavirus'

e) Gruppo A, Gruppo D e Rotavirus-like viruses

f) "Long segmented filamentous organisms"

g) Precedentemente classificato come Hexamita

Table 2: Distribuzione di gruppi di tacchini positivi per Poult Enteritis Mortality Syndrome (PEMS) e Coronavirus in North Carolina occidentale e orientale durante il 1996. Il dato è mostrato considerando separatamente le condizioni dei gruppi per PEMS e Corona

Table 2: Distribution of Poult Enteritis Mortality Syndrome (PEMS) and Coronavirus positive (Corona) flocks in Western and Eastern North Carolina in 1996. The data is shown considering the PEMS and Corona flock status separately

Condizione del gruppo	North Carolina Occidentale		North Carolina Orientale	
	# di gruppi	percentuale	# di gruppi	percentuale
PEMS positivi ¹	39	78	17	59
PEMS negativi	11	22	12	41
Totale	50	100	29	100
Corona positivi ²	35	70	5	17
Corona negativi	15	30	24	83

¹PEMS status basato sulla definizione inclusa nel testo

²Corona status basato sul test di immunofluorescenza diretta.

Tabella 3: Distribuzione delle condizioni dei gruppi per PEMS in funzione della loro condizione per Corona in North Carolina nel 1996

Table 3: Distribution of Poult Enteritis Mortality Syndrome (PEMS) flock status according to their Coronavirus status by North Carolina region in 1996

Condizione del gruppo	North Carolina Occidentale		North Carolina Orientale	
	PEMS Pos ¹	PEMS Neg	PEMS Pos	PEMS Neg
Corona positivi ²	28 (80%)	7 (20%)	4 (80%)	1 (20%)
Corona negativi	11 (73%)	4 (27%)	13 (54%)	11 (46%)
Test esatto di Fisher's ³	p-value = 0.71		p-value = 0.37	

¹PEMS status basato sulla definizione inclusa nel testo; ²Corona status basato sul test di immunofluorescenza diretta.

³p-values dal test esatto di Fisher realizzato sulle due tabelle 2x2

Verifica della relativa importanza dei vettori e di altri fattori di rischio

Sfortunatamente non è possibile in un testo breve come questo presentare tutto quanto è stato fatto per identificare possibili vettori, reservoirs ed altri fattori di rischio. Ma è in ogni caso importante sottolineare che l'accesso alle aziende da parte dei ricercatori è essenziale. Dal momento che l'eziologia della PEMS ed il suo controllo non sono stati rapidamente chiariti e definiti, alcune compagnie presero la decisione di limitare l'accesso alle aziende quale misura di un rigido protocollo di biosicurezza. Sebbene l'aver ridotto il "traffico" nelle aziende abbia dato i suoi benefici, tuttavia ha limitato di molto la possibilità di realizzare un'appropriata indagine epidemiologica. Peraltro è assolutamente possibile entrare in un'azienda infetta e poi uscirne senza necessariamente diffondere l'infezione. Questo è stato fatto per malattie altamente contagiose come l'Influenza Aviaria. E' necessario che le compagnie avicole produttrici si accorgano e riconoscano questo fatto affinché si possano realizzare degli studi in campo corretti e appropriati, che comprendono indagini sui lavoratori dell'azienda, raccolta di campioni e materiali (ad esempio catturando roditori, zanzare, mosche, scarafaggi e altri insetti), la verifica delle condizioni della lettiera ecc.

Un altro problema per gli epidemiologi è la c.d. "cattura del rumore bianco" (capture of white noise). Con questo termine alcuni colleghi descrivono i tentativi degli epidemiologi di ottenere dati da tutti i gruppi invece di

focalizzare l'attenzione sui gruppi problema. Se è vero che un lavoro dettagliato può essere normalmente realizzato solo osservando un sottogruppo di aziende in un'area infetta, è anche importante acquisire dei dati, seppure limitati, su tutti i gruppi presenti in quell'area allo scopo di ottenere una puntuale definizione della popolazione a rischio. Questo non è di solito considerato una priorità dall'industria.

Validità dei dati

"I governi (statistici) sono molto bravi e abili nel propagandare e realizzare statistiche. Le raccolgono, ne creano di nuove, le innalzano all'ennesima potenza, fanno la radice cubica e allestiscono pregevoli diagrammi. Ma quello che non bisogna mai dimenticare è che ciascuno di questi elementi proviene, in prima battuta, dall'orologio del villaggio, il quale prende nota e riferisce solo quello che gli piace".

Sir J. Stamp, 1929

Il problema della validità dei dati non è nuovo, ma oggi è più critico che mai. L'avvento della computerizzazione, sistemi di raccolta dei dati, e sensori elettronici ha reso più facile, se non addirittura di moda, raccogliere informazioni. L'integrazione delle attività da parte di gruppi industriali ha reso ancora più facile la raccolta e l'elaborazione di quei dati che coprono l'intero panorama produttivo avicolo. Questo set di informazioni è usato principalmente per facilitare l'elaborazione giornaliera di decisioni relative al management. Possono essere molto utili anche ai fini della risoluzione di problemi. Tuttavia, prima di fare tutto questo, bisognerebbe prima valutare e verificare la validità di questi dati.

La qualità dei dati è definita in termini di riproducibilità e validità. La riproducibilità (*reliability*) è una misura che esprime il grado di concordanza tra valori ottenuti dalla raccolta o realizzazione di misure ripetute su campioni o individui in specifiche condizioni, solitamente effettuati dalla stessa persona o laboratorio. Di fatto, si tratta di una misura della consistenza dei dati. La validità è il grado con cui una misurazione riflette la verità. La riproducibilità e validità di una registrazione di dati dipendono in larga misura dalle persone e dai test usati per ottenere le informazioni stesse, ma anche dal tipo di dati che sono raccolti. Da un punto di vista pratico i dati possono essere divisi in due gruppi: *hard* e *soft*.

I dati "*hard*" sono quelli che richiedono una minima interpretazione (durante la fase di registrazione del dato); come ad esempio la mortalità giornaliera, il numero di scarti, il sesso, la razza, l'identificazione del gruppo. I dati "*soft*" consistono in informazioni soggettive basate sull'interpretazione personale di un evento (cause di morte, segni clinici, categoria di scarti e categoria di riformati alla macellazione). Di solito ci si basa soprattutto su dati *hard* per valutare la produttività, mentre spesso ci si deve basare su informazioni *soft* quando ci si trova a dover descrivere delle situazioni problema. Per questo motivo è importante fare uno sforzo per valutare la validità delle informazioni. Inoltre, questa è anche un'ulteriore ragione per spiegare quanto sia importante consentire l'accesso ai ricercatori nelle aziende infette.

Sistema informativo geografico (GIS)

La tecnologia GIS è oggi comunemente utilizzata in Nord Carolina al fine di determinare rapidamente la dislocazione territoriale di aziende infette o con malattia in atto (Figura 1). Questo strumento ha innumerevoli applicazioni. E' impiegato, innanzitutto, dall'industria per individuare le aree a rischio e definire i migliori itinerari per evitare le aziende infette o di passare vicino ad aziende a rischio trasportando materiali od uccelli infetti. Permette di definire la distribuzione geografica dei focolai in corso di epidemia. Consente agli epidemiologi di determinare i c.d. raggruppamenti (*clustering*), e valutare statisticamente se lo stato di salute di un gruppo può essere associato alla vicinanza con certe zone. Diventa uno strumento di indagine validissimo quando associato a metodi molecolari che forniscono per ciascun caso informazioni esclusive ed identificative.

Coordinamento dei risultati provenienti da più parti

Posizione di concordanza

Questa è una situazione di coordinamento. Quando si verifica un'epidemia rilevante per entità, è importante poter disporre di un individuo o di un responsabile che si preoccupi che tutti i dati siano raccolti in maniera opportuna e poi diffusi e restituiti agli operatori sanitari ed a coloro che hanno l'incombenza di prendere le decisioni in merito. Questo è un ruolo attivo ma ha anche una funzione di controllo. Inoltre, bisogna che ai rappresentanti delle industrie, che hanno acconsentito ad eseguire test periodici sui gruppi dei propri allevamenti, sia ricordato di fornire i risultati e se questi non sono disponibili, è necessario registrare anche questa mancanza di informazioni, comunicando a tutte le altre compagnie che alcuni test non sono stati effettuati secondo gli schemi prefissati. In uno stato a forte produzione avicola come la Carolina del Nord, non è raro che i campioni vengano inviati a 8-9 differenti laboratori, alcuni dei quali situati in altri stati. Il poter disporre di un meccanismo che permetta di raggruppare tutte queste informazioni è estremamente funzionale alle indagini epidemiologiche. E' chiaro che un simile compito è svolto al meglio se né è incaricato da un'entità "neutrale", come il personale universitario.

Disseminazione delle informazioni a tutte le componenti interessate

Tutela della Privacy

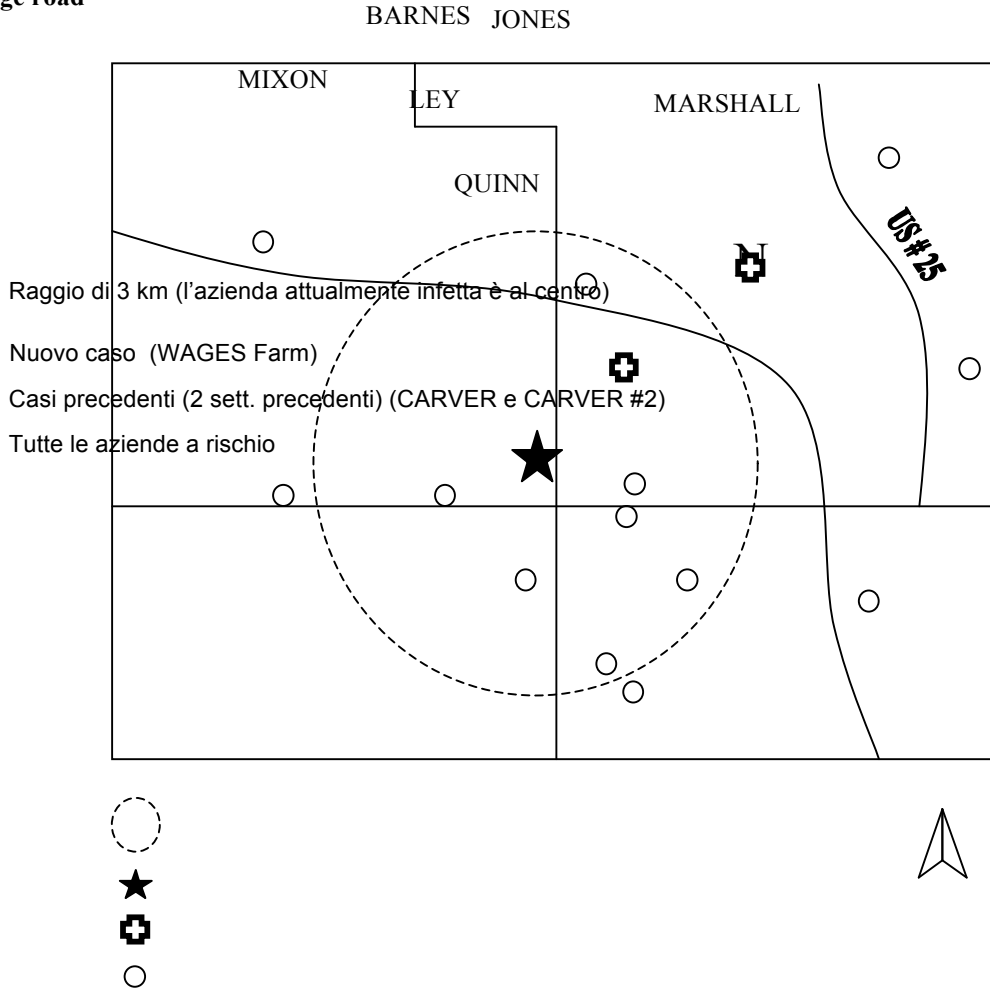
La "macchia" di avere una malattia infettiva è reale e spesso induce le persone a tenere l'informazione nascosta. Il solo sospetto di avere un gruppo infetto può essere sufficiente a far interrompere le esportazioni o modificare gli accordi economici. Ma anche il silenzio può costare caro. Il ritardo accumulato nel riconoscere l'emergenza di PEMS è stato catastrofico, consentendo alla malattia di diffondersi e causare un calo di produzione annua del 30% dal 1992 al 2000 (da 62 a 43 milioni di uccelli prodotti ogni anno). La responsabilità è un altro grosso problema. Nessuno vuole essere incolpato per la diffusione di una malattia. Ma quello di "puntare il dito" non è certo una strategia di controllo efficace ed è certo non una via a senso unico. E' importante convincere tutti gli

allevatori avicoli che nell'ambito di un'indagine epidemiologica le informazioni relative alle singole entità non sono diffuse come tali ma che dai dati raccolti, che vengono presentati in forma aggregata, possono derivare elementi essenziali e determinanti per lo sviluppo di efficaci strategie di controllo della malattia.

Figura 1: Esempio di una mappa di 3km di raggio prodotta per assistere una industria produttrice nel controllo della PEMS. Ogni mappa include informazioni relative a tutti i gruppi di tacchini presenti all'interno del raggio di 3km.

Figure 1: Example of 3 km radius map produced to assist the turkey industry in controlling a poult enteritis mortality syndrome (PEMS) epidemic. Each map includes information about all the turkey farms within this 3 km radius.

Range road



Nuovo caso	Aziende vicine	Gruppo integrato	Codice di allevamento
WAGES		JONES FOODS	23-352-22-67
	EZZELL	HARVEY LTD	23-352-22-69
	MILES	HARVEY LTD	23-352-22-76
	CARVER #2	IMPERIAL	23-352-22-34
	BARNES	HARVEY LTD	23-352-21-14
	MIXON	IMPERIAL	23-352-21-43
	JONES	JONES FOODS	23-352-21-26
	LEY	IMPERIAL	23-352-20-08
	ORR	IMPERIAL	23-321-22-64

Reporting

Molti epidemiologi mancano di fornire per tempo i risultati delle indagini sulla malattia da loro condotte. Troppo spesso questi epidemiologi sono più degli "storici" che persone in grado di risolvere problemi. Quando si verifica una simile situazione, molti soggetti dell'industria avicola perdono interesse in questo tipo di indagini e possono quindi trascurare o dimenticarsi di assistere gli epidemiologi nella raccolta dei dati. Tutto ciò può avere l'effetto di invalidare l'intero processo. La soluzione sta nello stabilire uno schema di raccolta dei dati finalizzato ad assistere coloro i quali sono deputati a prendere giornalmente quelle decisioni aventi lo scopo di contrastare l'andamento

epidemico di una malattia. Questo è stato recentemente ottenuto al meglio nel Nord Carolina quando le industrie di polli e tacchini si sono trovate a dover fronteggiare una serie di focolai di *Mycoplasma gallisepticum* (MG). Trattandosi di una malattia denunciabile in questo stato, il Dipartimento dell'Agricoltura del Nord Carolina (NCDA) ha unito le risorse delle industrie e dell'Università e si è proceduto all'indagine di ciascun caso di MG. I risultati dell'indagine venivano inviati per email entro 48 ore dalla visita al gruppo integrato cui appartiene l'azienda e al NCDA. Inoltre, si procedeva a visitare le aziende circostanti in cui erano presenti soggetti della stessa età di quelli infetti, nell'ambito di uno studio caso-controllo (casi e controlli sono stati poi esaminati nel tempo con il progredire dell'epidemia). Come per le aziende "caso", anche i risultati delle aziende negative venivano diffusi in maniera tempestiva senza aspettare la fine dell'indagine (questo forniva un profilo delle aziende negative, che veniva fatto circolare nell'ambito dei gruppi industriali allo scopo di educare gli allevatori). Dal momento che si sono usati numerosi test diagnostici in numerosi laboratori per determinare lo stato sanitario di ciascuna azienda della regione, gli epidemiologi si sono anche resi disponibili a fornire un servizio settimanale a tutte le compagnie, inviando per email un report con le coordinate delle aziende esaminate ed i risultati dei test condotti in ciascuna di esse. Questo servizio ha avuto una doppia funzione: ha fornito informazioni vitali per la gestione dell'epidemia e ha generato utili informazioni per gli epidemiologi. Con il progredire dell'epidemia è stato possibile mettere a confronto gruppi MG positivi con gruppi MG negativi. Questo tipo di approccio ha creato un reale rapporto di collaborazione tra industria, governo statale locale e Università, e se ha avuto successo è stato perché soddisfaceva i bisogni di tutti i partners.

Sistema di comunicazione

E-mails, FAX, convocazioni di riunioni sono i principali strumenti di comunicazione per organizzare meeting faccia a faccia e ottimizzare gli sforzi di controllo della malattia. Per essere efficaci, molti mattoni devono essere collocati in modo corretto: i dirigenti ed i responsabili dell'industria devono essere nella lista dei destinatari delle informazioni epidemiologiche; un sistema informativo geografico deve essere disponibile ed accompagnato dalla conoscenza delle coordinate di ciascuna azienda avicola; e devono esistere le definizioni per caratterizzare ciascun gruppo (positivo per malattia, sospetto, già positivo, o negativo), poiché la loro distribuzione geografica e temporale sono utili per sviluppare le strategie di controllo.

Implementazione delle misure di controllo

L'implementazione delle misure di controllo deve essere monitorata e questo monitoraggio funziona come un sistema di verifica che garantisce una migliore realizzazione (ad esempio, quando delle persone incaricate dell'implementazione delle misure di controllo sono avvisate che la loro attività è sottoposta a monitoraggio, so più inclini a seguire in maniera pedissequa il protocollo previsto). Questo ha anche la funzione di validare i risultati epidemiologici. In altre parole, se i risultati ottenuti sono accurati e le corrispondenti misure di controllo sono adeguate, ci si aspetta una riduzione del numero di focolai. Questo non è un obiettivo facile perché vi è la tendenza ad aumentare le probabilità di successo attraverso la messa in atto di una serie di misure di controllo in tutte le aziende nello stesso momento. Questo è vero specialmente quando ci si ha a che fare con una condizione molto grave come la PEMS. Inoltre, se a seguito dell'applicazione di misure di controllo non si ha una netta riduzione dell'incidenza di una malattia, è spesso difficile determinare la loro efficacia, soprattutto in assenza di un gruppo di controllo (ad esempio, gruppo di aziende in un'area infetta, nel quale non si attua un intervento di controllo).

Conclusioni

In conclusione, come ogni altro sistema di sorveglianza adattato ad essere usato dall'industria, le indagini epidemiologiche devono fornire i dati necessari in modo tempestivo per prendere le decisioni più corrette. E' responsabilità dell'industria in generale supportare queste attività e costituire un team che riceve le informazioni derivanti da questi studi e agisce di conseguenza. Per essere efficace, questo team dovrebbe essere costituito dai dirigenti delle industrie e dovrebbe avere una dimensione regionale. Il governo locale dovrebbe inoltre svolgere un primario ruolo di supporto nel fornire competenza diagnostica, magari anche gestendo e mantenendo efficiente il sistema informativo geografico.

Da un punto di vista tecnico, la maggior parte degli aspetti relativi all'esecuzione di indagini epidemiologiche in corso di malattie emergenti sono semplici e non molto difficili da mettere in atto, se si è in presenza di una forte leadership industriale e se i governi locali e le istituzioni universitarie sono disponibili a fornire un'attività di supporto. Essi devono essere soprattutto preventivi e non solo reattivi. In altre parole, è prima della comparsa di una grave malattia che è necessario fare della programmazione.

Bibliografia

1. Barnes H.J. and Guy J.S. Poultry enteritis-mortality syndrome ("spiking mortality") of turkeys. In Diseases of Poultry, 10th edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R., Saif, Y.M., editors. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 1997: 1025-1030.
2. Barnes H.J., Guy J.S., Vaillancourt J-P. Poultry enteritis complex. In Diseases of poultry: world trade and public health implications (CW Beard and MS McNulty, editors). Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 19 (2), 2000: 565-588.
3. Clark SR, Vaillancourt J-P (Editors). Proceedings & Technical Supplement of the Roche Turkey Coronavirus Workshop. 1998. 214 pages.
4. Vaillancourt JP, Barnes J, Wages D. Poultry Enteritis Mortality Syndrome: lessons learned on dealing with an emerging disease. 51st North Central Avian Disease Conference and Symposium on Emerging and re-emerging diseases. Columbus, Ohio. Oct. 8-10, 2000. Proc.
5. Vaillancourt J-P, Martinez A, Smith C, Ley DH. The epidemiology of *Mycoplasma gallisepticum* in North Carolina. 35th National Meeting on Poultry Health and Processing; 2000: 34-36.

Comunicazioni

	Pag.
1) G. Grilli, F. Battistoni, T. Rampin, Z. Bernardi, D. Gallazzi OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI COCCIDI IN TACCHINI COMMERCIALI	31
2) S. Beretta, G. Grilli, D. Gallazzi OSSERVAZIONI SUL RITMO ESCRETORIO DELLE OOCISTI IN TURDIDI IN CATTIVITA'	33
3) F. Paganelli, G. Tosi, P. Massi APPLICAZIONE E CONFRONTO CRITICO FRA L'UTILIZZO DELLE UOVA EMBRIONATE DI POLLO E POLYMERASE CHAIN REACTIONS, PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE	35
4) P. Massi, G. Tosi LIPIDOSI EPATICA IN TACCHINE DA RIPRODUZIONE DI 12 SETTIMANE DI ETA'	37
5) M. Cocchi, P. Massi, G. Tosi, M. Tamba PRESENZA DI <i>Campylobacter</i> SPP. NELLA CARNE DI POLLAME MACELLATA IN ROMAGNA	39
6) A. Piccirillo, A. Baiano, L. Dipineto, L.F. Menna, M. Kalby, S. Troisi, A. Fioretti INDAGINE SULLO STATO SANITARIO DI UCCELLI SELVATICI CATTURATI NEL "PARCO NAZIONALE DEL CILENTO E VALLO DI DIANO"	41
7) E. Bert, S. Cerruti Sola INDAGINE SULLA PRESENZA DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (PBBF) IN ALLEVAMENTI ITALIANI	43
8) A. Camarda, D. Pennelli, E. Circella., V. Ficarella, D. Di Modugno, G. Di Modugno RICERCHE ED OSSERVAZIONI SULLO STATO SANITARIO DEI COLOMBI DELLA CITTÀ DI PALO DEL COLLE (BARI) – RISULTATI PRELIMINARI	45
9) E. Bert, E. Grego, S. Cerruti Sola CLONAZIONE E SEQUENZIAMENTO DELL'ORF 1 DEL VIRUS DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (PBBFV)	47
10) G. Di Modugno, A. Camarda, V. Ficarella, E. Circella, D. Pennelli, D. Di Modugno RICERCHE SULLA SOPRAVVIVENZA DI <i>C. JEJUNI</i> SUL GUSCIO DI UOVA DA CONSUMO. REPLICAZIONE DEL GERME NEL CONTENUTO DI UOVA INFETTATE SPERIMENTALMENTE	49
11) M. Tamba, G. Tosi, P. Massi, F. Bacchiocchi VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA NEL BROILER DI DIVERSI PIANI VACCINALI CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE	51
12) A. Moreno Martin, P. Cordioli, F. Paganelli, A. Treccani, A. Zanella, A. Lavazza ISOLAMENTO E TIPIZZAZIONE PRELIMINARE DI UNA POTENZIALE NUOVA VARIANTE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE	53
13) P. Massi, F. Paganelli G. Tosi ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLA LEUCOSI AVIARE	55
14) G. Tosi, P. Massi INFEZIONE OCULARE DA <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> IN VARIE TIPOLOGIE D'ALLEVAMENTO	58
15) G. Cattoli, C. Terregino, V. Brasola, J.F. Rodriguez A. Zuin, I. Capua UTILIZZO DI UN VACCINO ETEROLOGO NEI CONFRONTI DELL'INFLUENZA AVIARIA COME VACCINO "MARKER": PROVA DI CROSS-PROTEZIONE E VALIDAZIONE PRELIMINARE DEL TEST DISCRIMINATORIO	60
16) C. Terregino, V. Brasola, B. Tramontan, D. Buson, F. Montesi, I. Capua PROVA DI CROSS-PROTEZIONE NEI CONFRONTI DELLA VARIANTE BRONCHITE INFETTIVA 624/I UTILIZZANDO VACCINI COMMERCIALI CONTENENTI LE VARIANTI M41 E 793/B	63

COMUNICAZIONE 1**OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI COCCIDI IN TACCHINI COMMERCIALI****G. Grilli, F. Battistoni, T. Rampin, Z. Bernardi, D. Gallazzi**

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria a Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: tacchino, coccidia.

Presence of coccidia in commercial turkeys

Key words: turkey, coccidia

Summary: The results of weekly counts of oocysts in the intestinal content of commercial turkeys are reported. Four different flocks were monitored in absence of coccidiosis problems. Monensin (90 ppm) was added in the feed. Production and mortality were normal. Presence of oocysts was positive in three flocks. Caecal coccidia, even if in little number, were always found, but without clinical signs.

Correspondence: Guido Grilli, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria a Patologia Aviaria, Università degli Studi, Via Celoria, 10, 20133 Milano guido.grilli@unimi.it

Introduzione

Nel tacchino la coccidiosi è sempre stata valutata come un problema sanitario di entità ed importanza economica ridotta. Questa opinione è attualmente sottoposta a verifica critica alla luce del fatto che la selezione genetica, se da un lato ha migliorato le performance produttive dei soggetti, dall'altro ha reso gli animali più vulnerabili anche a patologie comuni (1, 3, 7). Inoltre la coccidiosi nel tacchino pare un'entità morbosa dai contorni non ben definiti. Infatti mancano sicuri rilievi di tipo clinico e alterazioni intestinali costanti (1, 2, 3, 5, 6, 9) e la diagnosi richiede necessariamente il riscontro microscopico di oocisti nel contenuto intestinale o nelle feci. Anche nella nostra situazione produttiva si verifica talvolta il sospetto che forme enteriche giovanili possano essere riferite a coccidiosi. Ciò soprattutto all'osservazione che il trattamento con Amprolium riduce la sintomatologia, come segnalato anche all'estero da Sandstrom (8).

Materiali e Metodi

Le presenti indagini sono state condotte in quattro diversi allevamenti di tacchini commerciali in provincia di Verona su 3 partite di femmine (A: 36.400 animali; C: 5.400; e D: 5.200) e una di maschi (B: 12.000 soggetti) accasate tra luglio e settembre 2000. Il mangime somministrato era integrato con 90 ppm di Monensin-Na e 150 ppm di Dimetridazolo. I prelievi sono stati eseguiti settimanalmente fino all'ottava settimana raccogliendo separatamente il contenuto del duodeno, digiuno/ileo e dei ciechi da 6 soggetti, per lo più di scarto, per ogni capannone. Data la scarsità di materiale, nelle prime 2 settimane sono stati mescolati i prelievi dei 6 tacchini per ciascun tratto intestinale considerato. La conta delle oocisti è stata eseguita con la camera di Mc Master da materiale diluito in soluzione satura di NaCl e omogeneizzato come di routine. I campioni venivano sottoposti a conta in ordine casuale. I risultati delle conte individuali dei campioni dalla 3° all'8° settimana di vita venivano utilizzati per calcolare la media aritmetica delle oocisti presenti in ciascuno dei tratti intestinali considerati (Tabella 1)

Risultati

Nei soggetti sacrificati non venivano mai rilevate alterazioni della mucosa intestinale e ciecale riferibili a presenza di coccidi. I dati di mortalità delle 4 partite

controllate delineano degli andamenti diversi da gruppo a gruppo (Figura 1). Quasi altrettanto si può dire per il riscontro di oocisti nel contenuto intestinale (Tab. I). Nell'allevamento A si è verificata una elevata mortalità nelle prime due settimane, mentre a fine ciclo il dato complessivo arrivava al 4,6%. Oocisti sono state rinvenute a partire dalla 4° settimana, con persistenza e progressivo aumento della presenza di parassiti fino all'ottava settimana quasi esclusivamente a livello ciecale, con fugaci comparse a livelli minimi nei tratti del tenue. Nell'allevamento B, l'unico ciclo di maschi considerato ha pure subito una elevata mortalità nelle prime due settimane. La mortalità finale si è attestata su 8,6%. I coccidi hanno fatto comparsa alla 6° settimana, mantenendosi anche nelle due successive nel contenuto ciecale con livelli modesti. Del tutto insignificante la loro presenza a livello duodenale. Nell'allevamento C il ciclo si è chiuso regolarmente con percentuale di mortalità molto buona, pari a 2,5%. Totalmente assenti risultavano i coccidi in tutti i campioni considerati. Nell'allevamento D, simile al C per il numero di animali, dalla 3° settimana sono comparsi sintomi enterici, che si sono mantenuti nelle settimane successive nonostante i trattamenti farmacologici. Alta di conseguenza la mortalità complessiva: ben 5,4%. I coccidi sono comparsi nei campioni controllati alla 5° settimana e nei ciechi si sono mantenuti anche nelle due successive, ma in complesso la loro presenza è più che modesta. In tutti i cicli considerati la presenza di oocisti di coccidi era quantitativamente contenuta e soprattutto localizzata a livello di ciechi, con fugaci comparse nei due tratti di intestino tenue considerato. Dalla morfologia delle oocisti riscontrate, si può affermare che forme e dimensioni appaiono sostanzialmente sovrapponibili in tutti i campioni positivi: si tratta di oocisti di forma ellissoidale. Fanno eccezione i campioni dell'allevamento D, 5° settimana tratto intestinale digiuno/ileo, in cui le oocisti apparivano tutte di forma decisamente rotondeggiante. Misurazioni delle oocisti non sono state effettuate.

Discussione

Coccidi sono risultati presenti in tre delle quattro partite controllate. Sicuramente si tratta di più specie: in particolare quella riscontrata a livello di ciechi, dove più frequente e più elevata era la presenza di parassiti, potrebbe essere *E. adenoides* o *E.*

meleagridis. Purtroppo però le oocisti di queste due specie di *Eimeria* non sono distinguibili morfologicamente (4 e 7). Sarebbe comunque importante arrivare all'identificazione delle specie presenti dal momento che a *E. adenoides* è riconosciuta maggior patogenicità. Circa i coccidi presenti a livello di tenue, dal momento che pare che la segnalazione e la caratterizzazione di *E. innocua* e *E. subrotunda* siano rare e lacunose da far dubitare della loro esistenza (7), resta l'alternativa tra *E. dispersa* e *E. meleagrimitis*, differenziabili in base alle maggiori dimensioni di *E. dispersa*). I dati raccolti non consentono un giudizio sicuro sul ruolo svolto dai coccidi sull'andamento dei cicli controllati. Se da una parte è vero che la partita migliore (allevamento C) è risultata anche l'unica indenne dai parassiti, è innegabile che i valori di infezione riscontrati nelle altre tre sono così modesti da rendere inverosimile un loro rapporto causale con le forme morbose o la una loro incidenza sulle mortalità registrate, persino nell'allevamento D che mostrava ripetuti problemi di natura enterica.

Bibliografia

- 1) Anderson W. I., Ruff M. D., Reid W. M., Johnson J. K. Effects of turkey coccidiosis on intestinal pH. *Avian Pathology*. 1977. 6: 2, 125-130.
- 2) Anonimus. (1997) Which *Eimeria* species cause coccidiosis in turkeys? *World Poultry. Turkey Supplement* 16-17
- 3) Catchpole J., Maes L. Is coccidiosis a problem in turkeys? *World Poultry*, (1997), *Turkey Supplement* 30-33.
- 4) Davies S. F. M., Joyner L. P., Kendall S. B. (1963). "Coccidiosis". Oliver and Boyd Edinburgh. 115-125.
- 5) Euzeby J. (1987) "Protozoologie Medicale Comparee" Les protozoos des animaux et leurs relations avec les protozoos de l'homme. Vol II: Myxozoa- Microspora- Ascetospora- Apicomplexa, 1: Coccidioses (Sensu Lato). Collection Fondation Marcel Merieux. 238-242.
- 6) Irion T.C. An update on turkey coccidiosis. *International Hatchery Practice*. 1998. 12: 6, 15-17.
- 7) McDougald L. R., Reid W. M. (1997) "Coccidiosis" in "Disease of poultry". Tenth Edition. Edited by B. W. Calnek. Iowa State University, Iowa. 878-881.
- 8) Sandstrom J. D. Patterns of turkey coccidiosis. *Turkey World*. Juli-August, 24-27.
- 9) Sluis W. van der. Weapons against turkey coccidiosis. *World Poultry*. 1997. *Turkey supplement*, 18-19.

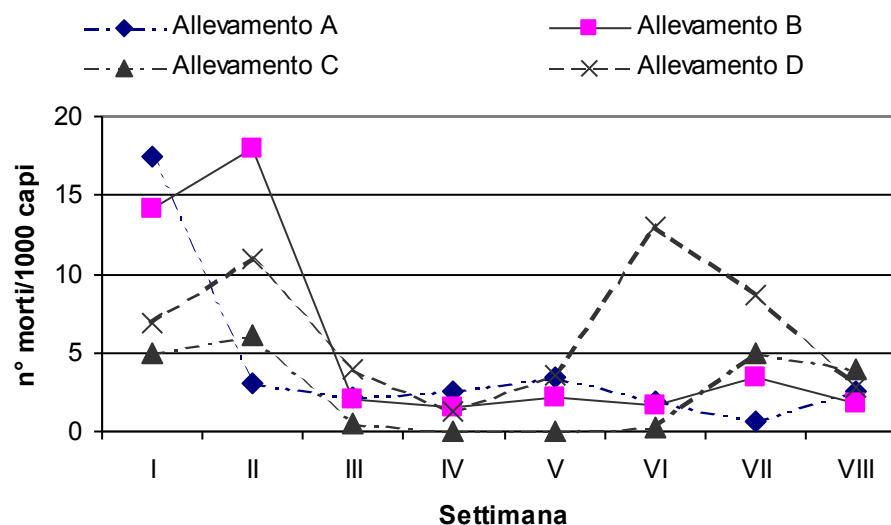
Tabella 1: Risultati delle conte delle oocisti presenti nei vari tratti intestinali (media di 6 soggetti).

Table 1: Counts of intestinal oocysts (ave. of 6 birds).

Allev.	Tratto intestinale	1° sett.	2° sett.	3° sett.	4° sett.	5° sett.	6 sett.	7° sett.	8° sett.
A	duod					16	8		
	dig/ileo								291
	cieco				816	1166	7733	70941	42100
B	duod							16	
	dig/ileo								
	cieco							23666	2166
C	duod								
	dig/ileo								
	cieco								
D	duod								
	dig/ileo						6825		
	cieco						400	5358	50

Figura 1: Andamento della mortalità settimanale

Figure 1: Weekly mortality (%)



COMUNICAZIONE 2**OSSERVAZIONI SUL RITMO ESCRETORIO DELLE OOCISTI IN TURDIDI IN CATTIVITA'****S. Beretta, G. Grilli, D. Gallazzi**

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: *Isospora* spp., *Turdus* spp., ritmo circadiano**Circadian rhythm of *Isospora* spp. in *Turdus***Key words: *Isospora* spp., *Turdus* spp., circadian rhythm

Summary: The presence of intestinal coccidia in 9 Redwing (*Turdus iliacus*), 8 Song Thrush (*Turdus philomelos*), 9 Blackbirds (*Turdus merula*), 10 Fieldfare (*Turdus pilaris*) was analysed. The birds had been kept in cages with permeable bottom for three months before left to freedom. In the four species of birds *Isospora* spp were found. The parasites were present for all the duration of the experiment, particularly in Fieldfare and Blackbird. In these two species was evident the emission of oocysts linked to the circadian rhythm. Oocysts output was mainly in the afternoon in the Blackbird faeces while in the morning in the Fieldfare respectively. If the photoperiod was artificially inverted also oocysts output was inverted as well.

Correspondence: Daniele Gallazzi, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Via Celoria 10, 20133 Milano. daniele.gallazzi@unimi.it

Introduzione

Lo studio delle coccidiosi aviarie è molto antico e numerosissimi lavori sono stati pubblicati, anche riguardanti le specie di passeriformi selvatici.

La prima descrizione di *Isospora* dei passeriformi risale al 1893. In quell'anno Labbé riferì di aver isolato dal cardellino (*Carduelis carduelis*) un protozoo, che denominò *Diplospora lacazii*, in seguito indicato come *Isospora lacazei*. Da quel momento sono state pubblicate numerose ricerche sull'infezione da *Isospora* spp. nelle specie selvatiche, anche alcune relative alla presenza di un ritmo circadiano nella escrezione delle oocisti in alcuni passeriformi (1,2,4,6,7). Le prime osservazioni al riguardo furono fatte da Boughton (1), il quale segnalò la presenza di un caratteristico andamento nell'eliminazione delle oocisti nel passero inglese (*Passer domesticus*) ed in altri uccelli passeriformi. Questo Autore riuscì a dimostrare che con la normale condizione di luce diurna tutti gli uccelli esaminati mostravano più alti livelli di oocisti di *Isospora* spp durante le ore pomeridiane, mentre risultava invertita la comparsa delle oocisti in condizioni di luce artificiale, con buio e riposo durante il giorno e illuminazione durante la notte. Lo stesso Autore stabilì inoltre che il caratteristico ritmo di escrezione del parassita non veniva alterato da digiuno durante le ore del mattino o del pomeriggio purché fossero mantenuti normali periodi di luce o buio. Schwalbach (7,8) confrontando il ritmo di escrezione di *Isospora* ed il comportamento dell'ospite (passero e cincia) vi trovò un nesso profondo, fornendo anche importanti delucidazioni riguardo alla trasmissione dell'infezione coccidica. I passeriformi domestici sono uccelli gregari che si riuniscono durante le prime ore del mattino e nel tardo pomeriggio per raggiungere i luoghi di alimentazione, che vengono frequentati per più giorni consecutivi. Qui eliminano le feci più ricche di oocisti che vengono reingerite durante la toelettatura, i bagni di sabbia e l'assunzione di cibo. La massima escrezione di oocisti si ha spesso solo nelle ore notturne così che risultano infettati i loro giacigli abituali. Tutto ciò finalizzato a mantenere uno stretto rapporto ospite/parassita come successivamente confermato dallo stesso Autore anche nelle cinciallegre (*Parus maior*) e da Cringoli

(4). Tutte queste osservazioni ci hanno stimolato a controllare se anche in altre specie di uccelli canori, come quelle del genere *Turdus*, comuni nelle nostre regioni, si verificasse lo stesso fenomeno.

Materiali e Metodi

Per lo studio sperimentale sono stati utilizzati 36 esemplari di uccelli appartenenti al genere *Turdus*: 9 Tordi sassello (*Turdus iliacus*), 8 Tordi bottaccio (*Turdus philomelos*); 9 Merli (*Turdus merula*); 10 Cesene (*Turdus pilaris*). Gli animali sono stati tenuti in gabbie standard e alloggiati nello stabulario oscurabile della Facoltà. La prova si è articolata in tre fasi: quantificazione dell'assunzione di cibo, di acqua e della produzione di feci (il controllo veniva effettuato 2 volte al giorno); determinazione della normale periodicità nella escrezione di oocisti (per una settimana sono stati eseguiti esami copromicroscopici mediante tecnica di Mc Master sulle feci emesse la mattina e la sera); inversione del bioritmo e ulteriore controllo dell'escrezione delle oocisti in tre soggetti campione per specie considerata (per 13 giorni è stata eseguita l'inversione del fotoperiodo, mediante luce artificiale fornita dalle ore 16,30 alle 9,30 del mattino successivo; anche in questo caso le feci venivano pesate e controllate 2 volte al giorno). Pur avendo sottoposto tutti i soggetti all'inversione del bioritmo, è stata effettuata la conta delle oocisti solo in 3 esemplari di merlo e 3 di cesena, precedentemente individuati come maggiori eliminatori di coccidi. Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica (procedura GLM e Kruskal Wallis test).

Risultati

Per quanto riguarda i dati inerenti il consumo alimentare, dell'acqua e il quantitativo di feci emesse nella giornata, i risultati sono riportati nella Tabella 1. All'interno di ogni specie non si sono registrate differenze significative per quanto concerne il consumo relativo di alimento e di acqua. Viceversa l'analisi statistica ha evidenziato una maggiore produzione di feci in tutte le 4 specie nel controllo pomeridiano ($P < 0,01$), non dimostrando però correlazione tra peso dell'animale e gli altri parametri controllati. Per quanto riguarda l'escrezione di oocisti è risultata positiva in tutte le specie. La intermittente e scarsa eliminazione riscontrata nelle specie sassello e

bottaccio, ci ha spinti a controllarne l'escrezione durante l'inversione del fotoperiodo solo nella specie merlo e cesena, di cui sono stati seguiti i tre esemplari maggiori eliminatori. Nella cesena l'escrezione delle oocisti risulta in quantità maggiore nei campioni raccolti la mattina, mentre nel merlo è risultato esattamente il contrario (Figura 1sx), con differenze statisticamente significative in ambedue le specie. Dopo l'inversione del fotoperiodo i valori medi dei 156 controlli bigiornalieri eseguiti sulle 3 cesene e i 3 merli, hanno mostrato nettamente l'inversione del ritmo escretorio (Figura 1dx).

Discussione

Il controllo dell'emissione di oocisti in condizione di luce naturale ha confermato la presenza di periodicità giornaliera nelle specie considerate. Nel merlo si è evidenziata una prevalenza pomeridiana e, al contrario, nella cesena una prevalenza mattutina. E' difficile trovare una spiegazione al ritmo di escrezione delle oocisti esattamente opposto presentato da merlo e cesena. Di sicuro questo dato deve essere messo in relazione alle abitudini e al diverso comportamento delle due specie in natura, così come trovato da Schwalbach (7, 8) nel passero e nella cincia. All'inversione del fotoperiodo ha corrisposto l'inversione dell'emissione di oocisti, che nel merlo è evidente già nella prima settimana mentre nella cesena questo fenomeno si è reso statisticamente significativo solo successivamente. In conclusione, dalle nostre osservazioni viene confermata la periodicità di escrezione di oocisti del genere *Isospora* anche nei turdidi mantenuti in cattività così come segnalato da Boughthon (1) nel passero e da Box (3) nel canarino. Sembra interessante questa conferma dell'esistenza di un ritmo circadiano nell'evoluzione del parassitismo sostenuta da *Isospora* spp., in

considerazione della facilitazione della trasmissione dell'infezione coccidica a nuovi individui appartenenti alla specie ospite. Nei turdidi da noi utilizzati, l'infezione coccidica non ha influito sullo stato sanitario dei soggetti, confermando il parere di Euzeby (5), secondo il quale le coccidiosi dei passeriformi non hanno importanza medica, ma solo biologica.

Bibliografia

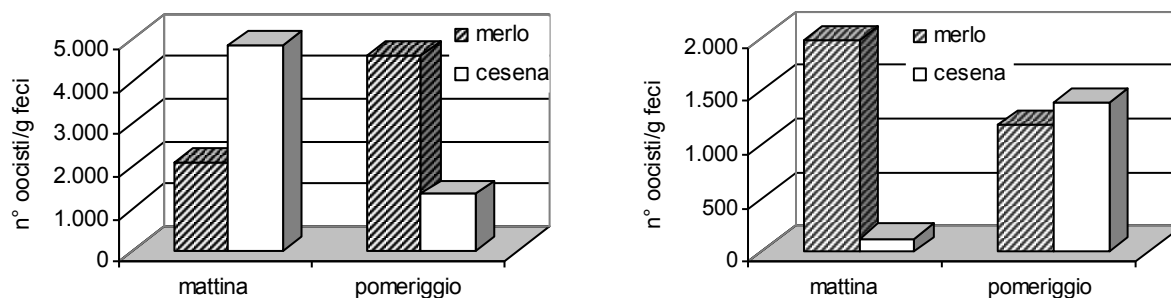
- 1) Boughthon D.C., (1933). Diurnal gametic periodicity in avian *Isospora*. Am. J. Hyg., (18):161-183.
- 2) Boughthon D.C. (1937) Studies on oocyst-production in avian coccidiosis - II. Chronic *isosporean* infections in the sparrow. Am. J. Hyg. 25:203-211.
- 3) Box D.E., (1977) Life Cycles of Two *Isospora* Species in the Canary, *Serinus canarius* Linnaeus. J. Protozool, 24(1): 57-67
- 4) Cringoli G., Queseda A., Capilongo R., Papparella V (1992). Primi risultati su alcuni aspetti biologici di *Isospora* sp (Apicomplexa: *Eimeriidae*) nel Verzellino (*Serinus serinus*) (*Passeriformes: Fringillidae*). Parassitologia, 34, suppl.1,120-121
- 5) Euzeby J.(1987). Protozoologie Médicale Comparée. Les Protozooses des Animaux et leurs Relations avec les protozooses de l'homme. Vol II: Myxozoa - Microspora - Ascetospora Apicomplexa, 1: Coccidioses (Sensu Lato). Collection Fondation Marcel Merieux
- 6) Grulet O., Landau I., Baccam D., (1982) *Isospora* du Moineau domestique, multiplicité des espèces. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 57(3)209-235.
- 7) Schwalbach, (1960). Die coccidiose der Singvogel I. Der Ausscheidungsrythmus der *Isospora*-Oocysten beim Haussperling (*Passer domesticus*). Zbl. Bakt. I. 178:263-276
- 8) Schwalbach G., (1961). Die coccidiose der Singvogel II. Beobachtungen an *Isospora*-Oocysten aus einem Weichfresser (*Parus major*) mit besonderer Berücksichtigung des Ausscheidungsrythmus Zbl. Bakt. (orig.) 181:264-279.

Tabella 1: Consumi alimentari, di acqua e produzione di feci nei turdidi controllati (valori medi espressi in g e in % rispetto al p.v.). **=P<0,01

Table 1: Feed and water consumption, feces production in *Turdus* spp. (average of values in g and in % as to body weight) **=P<0,01

Specie	Peso medio (g)	Prelievo	Mangime		Acqua		Feci	
			grammi	% p.v.	grammi	% p.v.	grammi	% p.v.
Tordo sassello	65,11	matt.	8,04	12,35	11,93	18,32	8,20	12,59
		pom.	6,96	10,69	12,73	19,55	12,88**	19,78
T. bottaccio	68,75	matt.	9,52	13,84	15,52	22,57	9,58	13,93
		pom.	7,73	11,24	14,54	21,14	12,83**	18,66
Merlo	84,56	matt.	9,56	11,30	20,04	23,70	11,29	13,35
		pom.	7,95	9,4	16,88	19,96	15,11**	17,87
Cesena	101,7	matt.	13,07	12,85	19,10	18,78	14,60	14,35
		pom.	11,92	11,72	20,17	19,83	22,53**	22,15

Figura 1: Andamento dell'emissione di oocisti prima (sinistra) e dopo (destra) l'inversione del fotoperiodo
Figure 1: N° of oocysts (average) before (left) and after (right) the reversal of photoperiod



COMUNICAZIONE 3

APPLICAZIONE E CONFRONTO CRITICO FRA L'UTILIZZO DELLE UOVA EMBRIONATE DI POLLO E POLYMERASE CHAIN REACTIONS, PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

F. Paganelli, G. Tosi, P. Massi

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

Parole chiave: virus della bronchite infettiva aviaria, polymerase chain reaction, uova embrionate di pollo

Application and critical comparison of the use embryonated chicken eggs with the polymerase chain reaction, to identify the Infectious bronchitis virus

Key words: infectious bronchitis virus, polymerase chain reaction, embryonated chicken eggs

Summary: Infectious bronchitis virus (IBV), the prototype of the coronavirus family, is major cause of economic losses in the poultry industry and can be involved in respiratory disease, nephritis and poor egg production and quality. This study compares the polymerase chain reaction (PCR) with virological traditional methods, normally used for detection of IBV. The PCR show high sensitivity and specificity, however, the PCR is less time consuming in comparison to virus isolation.

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

Introduzione

Il virus della bronchite infettiva aviaria (IBV) è un prototipo della famiglia Coronaviridae. È una malattia virale acuta, infettiva, sistemica ed altamente contagiosa del pollo. Presenta principalmente sintomi e lesioni respiratorie, renali o dell'apparato riproduttivo (2). Da ottobre 2000 a Luglio 2001 per ogni campione, che per dati anamnestici, clinici e anatomo-patologici rispecchiava una sintomatologia riferibile alla bronchite infettiva aviaria (IBV) è stato seguito uno specifico iter diagnostico. Per la ricerca dell'agente virale si è applicata sia la metodica classica, che utilizza le uova embrionate di pollo SPF, sia la PCR. Il virus dell'IB è pleomorfo, di 80-200 nm di diametro, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto di envelope. Il genoma virale è composto da 27.5 Kb, che codifica per tre proteine strutturali: la proteina S, la proteina M glicosilata della membrana e la proteina N fosforilata del nucleocapside. La proteina S presenta 8 determinanti antigenici, 6 in S1 e 2 in S2. La proteina S è risultata estremamente variabile, soprattutto la subunità S1. Numerosi sierotipi noti differiscono, infatti, tra loro per più del 20% dei loro aminoacidi di questa proteina. La subunità S1 è responsabile della virus neutralizzazione (VN), dell'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) e della differenziazione sierotipica (4). Con la PCR si va a ricercare ed amplificare proprio un locus genico della subunità S1, per potere determinare la presenza o meno dell'IBV. Nel presente lavoro si è cercato di mettere a punto un efficace protocollo di lavoro per l'identificazione dell'IBV tramite PCR, e di conseguenza valutare la sua vera maggior sensibilità e specificità rispetto alla metodica classica, senza dimenticare la possibilità di ottenere una diagnosi in tempi più brevi.

Materiali e Metodi

Il campione di partenza, in base alle lesioni presenti nell'animale, è costituito da raschiato tracheale, polmone, rene, tonsille cecali e ovidutto; dopo una omogenizzazione con PBS antibiotato, viene centrifugato a 3,000x g e filtrato su filtri di 450 nm. A questo punto il campione viene inoculato su uova SPF di 9 gg. per via intrallantoidea per 3 passaggi consecutivi. L'identificazione del virus si basa sulle

lesioni tipiche dell'embrione: mortalità, nanismo, arrotolamento e penne arricciate. Inoltre si valutano sia gli esiti dell'immunodiffusione su agar gel con antisieri IBV, sia la morfologia del virus tramite la microscopia elettronica (2). Dallo stesso campione inoculato su uova si esegue parallelamente l'estrazione e la purificazione dell'RNA, utilizzando il Trizol-Reagent (Invitrogen®, USA): una soluzione monofasica di fenolo e guanidinio isotiocianato, secondo la tecnica modificata descritta da Chomezynski e Sacchi (3). Ottenuto il nostro campione di RNA si procede alla retrotrascrizione utilizzando il ProSTAR™-kit (Stratagene®, USA), con l'aggiunta del primer XCE2- (Tabella 1) complementare al trascritto.

Tabella 1: Sequenza e posizione dei primers
Table 1: Sequence and position of primers

Nome	Sequenza (5'-3')	Posizione della Sequenza
XCE1+	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	729-249
XCE2-	CTCTATAAACACCCCTTACA	1170-1193

Il prodotto di retrotrascrizione viene utilizzato direttamente nel saggio di PCR previa l'aggiunta dei reagenti e del tampone necessario che fanno parte della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il primer "forward" XCE1+ e il primer "reverse" XCE2- che producono un frammento di 464bp (tab1) (1). La reazione avviene in un termociclatore automatizzato (Gene Cycler™, Bio-Rad®, USA) secondo il seguente profilo di amplificazione: 5 minuti a 94°C (hot start) seguito da 35 cicli costituiti da 3 step: 94°C per 30 secondi (denaturazione), 55°C per 30 secondi (ibridazione dei primers), 72°C per 1 minuto (estensione); al termine dei cicli 1 minuto a 72°C per eventuali estensioni. Il prodotto amplificato viene sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 7,5%,

colorazione con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2 e in figura 1.

Discussione

Questi primi dati hanno messo in evidenza una maggior sensibilità e specificità della PCR (42%) rispetto alla metodica classica (21%). Questo è da ricercarsi soprattutto nella capacità della PCR di riconoscere la presenza di poche copie di una particolare sequenza di DNA o RNA all'interno di un campione sospetto; quindi è possibile ottenere in tempi brevi alcuni microgrammi di DNA a partire da un numero molto ridotto di molecole iniziali. Inoltre non è necessario che il virus sia integro o replicativo, poiché si va a ricercare uno specifico *locus* genico del genoma virale interessato, evidenziandone così la presenza senza la necessità dell'isolamento. Spesso con l'inoculo su uova embrionate non si riesce ad isolare il virus, con le sue tipiche lesioni, per la presenza di infezioni secondarie, invece con la PCR questo problema non sussiste. Comunque con entrambe le metodiche per poter fare una corretta diagnosi virologica bisogna sempre tenere in considerazione l'età dell'animale, i segni clinici, le lesioni anatomico-patologiche e i diversi programmi vaccinali adottati. La PCR è una metodica apparentemente semplice e attualmente di "moda", ma in realtà soggetta a molte problematiche, legate

alla facilità della contaminazione, all'interpretazione del prodotto di amplificazione, alla perfetta conservazione del campione da analizzare (quando si amplifici a partire da RNA).

In conclusione, tutti questi concetti devono essere presi in considerazione per valutare l'opportunità di allestire un saggio di PCR, guidati dal principio che l'attendibilità della PCR in campo diagnostico non è legata soltanto alla corretta esecuzione e valutazione della singola reazione di amplificazione, ma è vincolata dal suo inserimento in una complessa ed articolata routine diagnostica.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

1. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). "Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions". *Avian Pathology*, 28,593-605.
2. Cavanagh D., Naqi S.A. (1997). "Infectious bronchitis". In *Disease of Poultry, 10th Edition*. (Calnek, B.W., ed.) pp. 511-26. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.
3. Chomezyski P., Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytic Biochemistry*, 162,156-9.
4. Wang X., Khan M.I., (1999). "Amultiplex PCR for Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus". *Molecular and Cellular Probes*, 13,1-7.

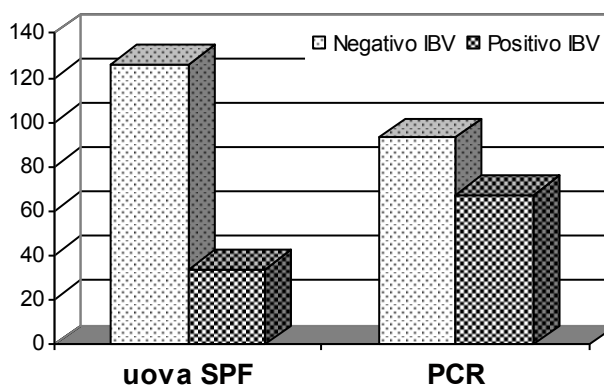
Tabella 2: Risultati ottenuti dallo studio in parallelo su uova embrionate SPF e PCR

Table 2: Results obtained with embryonated chicken eggs SPF and PCR

Metodo applicato	Positivo per IBV	Negativo per IBV	% positivi
Inoculo su uova embrionate SPF (3 passaggi)	34	26	21%
PCR	67	93	42%
Totale campioni esaminati= 160			

Figura 1: Risultati della ricerca virologica di IBV su campioni sospetti

Figure 1: Results of virological research



COMUNICAZIONE 4**LIPIDOSI EPATICA IN TACCHINE DA RIPRODUZIONE DI 12 SETTIMANE DI ETÀ'****P. Massi, G.Tosi***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.*

Parole chiave: epatosi, tacchine da riproduzione, sindrome dismetabolica.

Hepatic lipidosis in 12 weeks old turkey breeders

Key words: hepatic lipidosis, turkey breeders, complex metabolic disease.

Summary: 18,000 twelve weeks old turkey hens increased mortality due to hepatic lipidosis. Some hens showed signs of dyspnea and cyanosis before death. Mortality was for 3 weeks and resulted in the death of 4% turkey hens. The nutritional and environmental factors that may contribute to the development of hepatic lipidosis in turkeys are discussed.

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

Introduzione

La lipidosi epatica del tacchino è descritta come una sindrome ad eziologia incerta, di probabile origine nutrizionale. Ne sono spesso colpite le tacchine da riproduzione tra 15 e 25 settimane di età. La malattia è caratterizzata da mortalità improvvisa che può arrivare al 5% nell'arco di alcuni giorni e da gravi lesioni steatosiche e necrotiche a carico del fegato (1). La sindrome è stata finora descritta prevalentemente negli USA e in Canada. La causa primaria della lipidosi è tuttora sconosciuta. Si tratta, probabilmente, di una patologia multifattoriale in cui si associano cause alimentari, ambientali e manageriali (2). I gruppi colpiti sono generalmente alimentati con diete a basso tenore proteico ed alti livelli energetici. Nella patogenesi di questa sindrome sembrano intervenire fattori ambientali (temperature elevate e variazioni del programma-luce) che alterano l'assunzione dell'alimento favorendo l'accumulo di lipidi nel fegato. Spesso intervengono alti livelli di perossidi che, favorendo la perossidazione lipidica, provocano lesioni vasali determinando la comparsa di edema polmonare, necrosi ed emorragie epatiche.

Materiali e metodi

Dati di campo: del caso in esame venivano raccolti dati anamnestici, segni clinici, indici di morbilità e mortalità, interventi terapeutici adottati. Venivano eseguiti esami necroscopici su soggetti morti conferiti al laboratorio.

Esami di laboratorio: da organi prelevati in sede necroscopica venivano allestiti esami batteriologici, virologici, istopatologici e chimico-tossicologici. Da campioni di sangue di 13 soggetti appartenenti al gruppo colpito e di 15 tacchine provenienti da un gruppo indenne di pari età venivano eseguiti esami ematochimici. Il mangime veniva sottoposto, a cura del laboratorio aziendale, a indagini indirizzate alla ricerca delle principali micotossine.

Risultati e Discussione

Il gruppo colpito era composto da 18000 tacchine di 12 settimane di età destinate alla riproduzione distribuite in 6 capannoni. Durante il mese di gennaio si segnalava una mortalità improvvisa, preceduta in qualche soggetto da dispnea e cianosi apprezzabili. La sindrome si diffondeva in 3 settimane in tutti i capannoni raggiungendo una mortalità totale del 4%. All'esame anatomico-patologico i soggetti colpiti si presentavano in ottimo stato di nutrizione. Le principali lesioni macroscopiche osservabili erano: cianosi della

testa e delle masse muscolari, edema polmonare, emorragie epicardiche, pancreatiche e duodenali, presenza di sangue scarsamente coagulato. Il fegato si presentava distrofico, aumentato di volume, disseminato di aree necrotico-emorragiche "a carta geografica" e con vaste aree steatosiche. Gli esami di laboratorio risultavano negativi nei confronti delle principali infezioni virali aviari. Gli accertamenti batteriologici portavano all'isolamento di un ceppo di *E.coli* (sierotipo O88) dal fegato. Il ceppo isolato si dimostrava sensibile, in vitro, alle più comuni classi di chemio-antibiotici (beta-lattamici, chinoloni, cefalosporine). L'esame istopatologico evidenziava lesioni solo nel fegato e, in particolare, epatodistrofia caratterizzata da steatosi, necrobiosi e necrosi epatocitaria, proliferazione dei dotti biliari e diffuse emorragie. In qualche caso si osservavano anche modesti infiltrati linfocitari e plasmacellulari. Nel mangime non venivano rilevate quantità significative di micotossine. Il profilo ematochimico del gruppo colpito non si discostava da quello del gruppo coetaneo indenne, fatta eccezione per l'elevato livello dell'enzima epatico GOT AST (768.2 UI/L contro una media di 337 UI/L del gruppo sano) (Tabella 1). I risultati degli esami chimico-tossicologici, eseguiti sugli organi, sono riportati in tabella 2.

Tabella 1: Profilo ematochimico**Table 1: Haematochemical profile**

Esame	u.m.	Media dei valori ematochimici	
		Tacchini con lipidosi	Tacchini sani
WBC	mig.	3.03	2.5
RBC	mil.	2.63	1.67
HCT	%	14.9	22.7
azotemia	mg/dl	9	6.4
creatinina	mg/dl	0.16	0.3
bil.TOTALE	mg/dl	0.39	0.58
bil.DIRETTA	mg/dl	0.15	0.06
CALCIO	mg/dl	4.66	11.94
GOT AST	UI/l	768.2	337
GOT ALT	UI/l	34.0	34.2
CK	UI/l	1238	1441
LDH	UI/l	640	696
ALP	UI/l	140	62
amilasi	UI/l	392.3	304.3
lipasi	UI/l	162.4	178.6

Tabella 2: Determinazione chimica dagli organi emuntori dei tacchini con lipidosi

Table 2: Chemical examination of organs of turkeys with lipidosis

Determination	Metodo	Esito su T.Q.
Aflatossina B1	HPLC	Non rilevato
Ocratossina	HPLC	Non rilevato
Coumafuryl	HPLC	Non rilevato
Warfarin	HPLC	Non rilevato
Coumatetralyl	HPLC	Non rilevato
Coumaclor	HPLC	Non rilevato
Bromadiolone	HPLC	Non rilevato
Pesticidi clorurati	Gas cromatografia	Non rilevato
Pesticidi fosforati	Gas cromatografia	Non rilevato

Il gruppo colpito veniva sottoposto a terapia antibiotica, mediante l'impiego di enrofloxacin (50 gr/100 litri di acqua per 5 giorni), e a terapia antiossidante attraverso la somministrazione di vitamina E con l'aggiunta di vitamina K1 e vitamine del complesso B. Venivano inoltre apportati correttivi alla razione alimentare di cui veniva ridotto il livello energetico.

Il caso sopradescritto appare del tutto analogo alla sindrome denominata "epatosi con degenerazione grassa e sindrome emorragica" descritta in letteratura e considerata come patologia dismetabolica ad eziologia multifattoriale (3). La diagnosi è scaturita dall'esame dei dati anamnestici (mortalità improvvisa senza segni clinici apparenti, età dei soggetti colpiti), dalle lesioni epatiche riscontrate nel corso dell'esame anatomo-patologico e dalle lesioni microscopiche

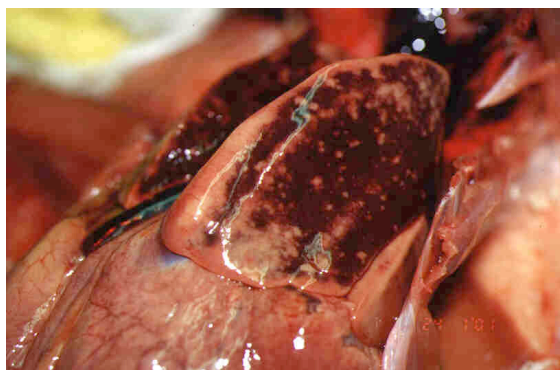
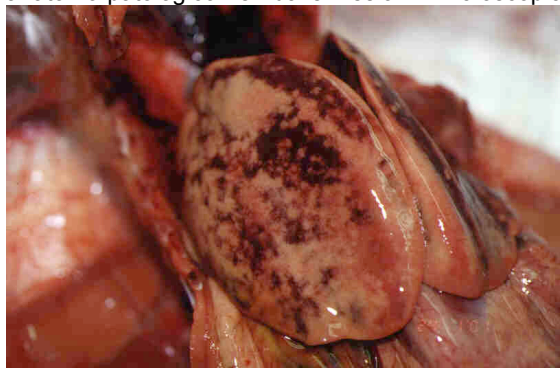
caratterizzate da epatodistrofia associata a necrosi. L'analisi del profilo ematochimico ha inoltre evidenziato una epatopatia iperacuta. Un ulteriore supporto diagnostico è scaturito dalla esclusione di agenti infettivi importanti. L'isolamento del ceppo di E.coli sierotipo O88 è da considerare come una complicazione secondaria determinata dalla mobilitazione del ceppo batterico dalla sede intestinale verso un locus (fegato) indebolito da gravi fenomeni degenerativi. La causa primaria dell'epatopatia è difficilmente spiegabile. Le tacchine future riproduttrici vengono alimentate "ad libitum" con diete altamente energetiche e a basso tenore proteico. L'eccessiva conversione dei carboidrati in lipidi attraverso la gluconeogenesi epatica favorisce la comparsa di fenomeni degenerativi di tipo steatosico a carico del fegato. A ciò si aggiungono frequentemente altri squilibri alimentari (carenze di aminoacidi essenziali e di fattori antiossidanti), situazioni di stress (temperature elevate e sbalzi termici), alterazioni ormonali e micotossine.

Bibliografia

Barnes H.J. (1997) "Hepatic lipidosis of turkeys" in: Calnek B.W.: Diseases of Poultry 10th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1042-1044.

Gazdzinski P., Squires E.J., Julian R.J. (1994) "Hepatic lipidosis in turkeys". Avian Diseases, 38, 379-384.

Nagalakshmi D., Rama Rao S.V. (2000) "Fatty liver syndrome in layers". Poultry International, 39, 48-59.



COMUNICAZIONE 5**PRESENZA DI *Campylobacter* SPP. NELLA CARNE DI POLLAME
MACELLATA IN ROMAGNA****M. Cocchi, P. Massi, G. Tosi, M. Tamba***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.*Parole chiave: *Campylobacter* spp., pollame, prevalenza.**Survey of the incidence of *Campylobacter* spp. infection in poultry meat in Emilia Romagna.**Key words: *Campylobacter* spp., Poultry meat, Prevalence.

Summary: *Campylobacteriosis* has become recognised as a major cause of human enteritis in many developed countries. A survey about *Campylobacter* spp. isolated from poultry meat in Emilia Romagna was performed.

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

Introduzione

Le tossinfezioni alimentari sostenute da *Campylobacter* spp (in particolar modo *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*) costituiscono una delle cause più frequenti di enterite nell'Uomo. Diverse sono le fonti di infezione: consumo di latte crudo, acqua contaminata, carne di volatili, di suino e di bovino, contatto con feci infette di animali d'affezione (5). Fra di esse sia il consumo di carne di pollame cotta poco e/o in modo inadeguato, sia la sua erronea manipolazione costituiscono il principale serbatoio di infezione per l'Uomo (1). L'infezione sostenuta da *Campylobacter* spp. da luogo ad una enterite acuta, solitamente autolimitante, caratterizzata da febbre alta e persistente, diarrea (inizialmente acquosa e successivamente sanguinolenta) e violenti crampi addominali. Essa può dare luogo, inoltre, a complicazioni sia a livello intestinale (pancreatite, colecistite ed emorragie del tratto gastro-intestinale) sia a livello extra-intestinale, solitamente rare. Fra di esse ricordiamo la sindrome di *Guillain - Barrè* e la sindrome di *Miller Fisher*, neuropatie acute immuno-mediate, oltre alla sindrome emolitico-uremica (1,2). Scopo del presente studio è stato verificare l'esistenza di una contaminazione da *Campylobacter* spp. nella carne di pollame macellata in Emilia Romagna.

Materiali e metodi

La ricerca è stata effettuata nel periodo 1 gennaio – 31 luglio 2001 su busti di broilers e/o sulle parti di questi (cosce, sovracosce e petto) prelevati, alla fine della catena di macellazione o lungo la catena di lavorazione (prima dell'imballaggio), dai servizi Veterinari dell'A.S.L. di Forlì, Cesena e Rimini. I campioni, dopo essere stati prelevati sterilmente, sono stati messi in appositi sacchetti e conferiti, alla temperatura di 4°C al laboratorio della Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER. Una volta giunto in laboratorio, ogni campione è stato sottoposto all'isolamento ed identificazione dei *Campylobacter*, secondo lo schema qui di seguito indicato. 25 g muscolo+225 ml di *Campylobacter* *Enrichment broth* (*BHI*+ *Campylobacter* *Growth Supplement* e *Modified Karmali Selective Supplement*, *Oxoid*), preparato presso la Sezione di Forlì, incubato a temperatura di 42°C per 48 ore; isolamento effettuato inoculando i seguenti terreni: *Skirrow agar* (SK) - preparato presso la Sezione di Brescia -; *Karmali agar* (KA) e *Preston agar* (PR), -entrambi preparati presso la Sezione di

Forlì-, posti in termostato a 42°C, in microaerofilia (*BBL Campy Pouch Microaerophilic System. Becton Dickinson*) per 24- 72 ore. Trascorso tale periodo, le colonie sospette sono state isolate su *Agar Sangue* (fornito dalla Sezione di Brescia), incubato in microaerofilia per 24-72 ore a 37°C. Al termine di detto periodo, le colonie emolitiche sono state sottoposte a colorazione di *Gram* e test della catalasi e, successivamente, solo le colonie *Gram* negative, con caratteristica morfologia e catalasi + sono state sottoposte a prove di identificazione di genere (idrolisi del sodio ippurato, sensibilità all'acido nalidixico e alla cefalotina - secondo metodo Kirby-Bauer, usando dischetti da 30 µg della *Oxoid*, nel primo caso e *BBL* nel secondo caso -, *Api Campy -Bio Merieux*-).

Il numero totale dei campioni esaminati è stato pari a 70; di questi 37 erano campioni di muscolo con pelle e 33 senza pelle.

Per quanto riguarda l'analisi statistica approntata al fine di verificare se la presenza della pelle possa essere considerata come fattore di rischio si è utilizzato l'*Odds Ratio* (OR), parametro che permette di indicare quante volte è più alta la probabilità di presenza di *Campylobacter* spp. in campioni di muscolo con pelle, rispetto a quelli senza pelle. Inoltre, il confronto fra gli esiti ottenuti con i diversi terreni selettivi è stato effettuato tramite il metodo statistico del χ^2 secondo *Mc Nemar* per campioni non indipendenti.

Risultati

Riportati nelle tabelle 1 e 2 e in figura 1.

Dal confronto fra i risultati ottenuti con i tre terreni di arricchimento è emerso che il PR ha una sensibilità apparente del 96%, KA e SK una sensibilità del 60% e del 56%, rispettivamente. Confrontando i test a due a due mediante il calcolo del χ^2 modificato di *Mc Nemar* si è visto che PR ha una sensibilità significativamente superiore sia a KA ($\chi^2= 5.81$; $P= 0.012$) che a SK ($\chi^2= 6.75$; $P=0.006$). Dall'analisi condotta è emerso che la presenza di *Campylobacter* è legata alla presenza della pelle. Questo risultato è stato ottenuto valutando l'OR, che per la presenza della pelle è uguale a 14.67 (3.78-56.93, intervallo di confidenza 95%). Questo sta a significare che nel muscolo con pelle la probabilità di isolare il batterio è 14.67 volte superiore rispetto al muscolo senza

Discussione

Questo studio ha messo in evidenza due elementi che vogliamo sottolineare: da un lato la pelle quale fattore di rischio nella contaminazione delle carcasse avicole e, dall'altro l'elevata sensibilità di PR, quale terreno di arricchimento.

Nel primo caso, diversi AA (3;4;6) hanno sottolineato il fatto che la contaminazione della pelle e delle piume contribuisce non solo ad inquinare la catena di macellazione, favorendo la diffusione del batterio anche a successive partite, ma anche far sì che l'elevato tasso di contaminazione costituisca fonte di contaminazione per i successivi impianti di lavorazione. Tutto questo, unito al mancato rispetto delle norme igieniche può contribuire ad innalzare la percentuale di positivi sino a valori molto elevati al momento della vendita (4;7).

Ne consegue così che il miglioramento delle misure di biosicurezza da un lato e il corretto maneggiamento della carne avicola anche in ambito casalingo possono contribuire ad un abbassamento dei casi di tossinfezione alimentare.

Per quanto riguarda, invece, l'uso dei tre diversi terreni di isolamento vi è da sottolineare l'elevata sensibilità di PR, che ha permesso di isolare *Campylobacter spp.* in casi in cui l'uso di uno solo degli altri terreni non lo avrebbe permesso. Questo ha fatto sì che la prevalenza da noi ottenuta (37.5%) si attesti su valori riscontrati da alcuni AA. (3;7), discostandosi profondamente da quelli riportati da Lo Schiavo *et al* (8), mettendo in luce, quindi la difficoltà che si può incontrare nell'iter di isolamento del germe.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa collaborazione i sigg.ri A. Chiusi e S. Bussi, tecnici del laboratorio di batteriologia della Sezione IZS di Forlì.

Bibliografia

- Allos B.M. (2001). *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clin. Infect. Dis. 32:1201-1206.
- Ang C.W, De Klerk M.A, Endtz H.P, Jacobs B.C, Laman J.D, Van Der Mechè F.G.A, Van Doorn, P.A. (2001). Guillain-Barrè Syndrome and Miller Fisher Syndrome Associated *Campylobacter jejuni* Lipopolysaccharides induce Anti-GM₁ and Anti-GQ_{1b} Antibodies in rabbits. Infect. Immun. 69, 4: 2462-2469.
- Berrang M.E, Buhr R.J and Cason J.A. (2000). *Campylobacter* Recovery from external and internal organs of commercial broiler carcass prior to scalding. Poultry Sci. 79: 286-290.
- Berrang M.E, Ladely S.R and Buhr R.J.(2001) Presence and level of *Campylobacter*, *Coliforms*, *Escherichia coli* and total aerobic bacteria recovered from broiler parts with and without skin. J. Food Prot. 64,2:184-188.
- Butzler J.P. and Oosterom J. (1991). *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food Microbiol. 12: 1-8.
- Di Modugno G., Camarda A., Nasti R. (1997). Introduzione e propagazione del *Campylobacter jejuni* in allevamenti di *broilers*. Presenza del germe su cute e piumaggio prima della macellazione e possibile influenza sulla contaminazione di carni. La Selezione Veterinaria. 9: 757-767.
- Kramer J.M, Frost J.A, Bolton F.J. and Wareing D.R.A. (2000). *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection. J. Food Prot. 63, 12: 1654-1659.

- Lo Schiavo A, Minniti A, Panebianco A, Iannuzzi L. (1991). Isolamento di *Campylobacter jejuni* da polli totalmente eviscerati. Archivio Veterinario Italiano. 42, 1: 18-21.

Tabella 1: Isolamento di *Campylobacter spp.*

Table 1: Isolation of *Campylobacter spp.*

Isolamenti	Muscolo con pelle	Muscolo senza pelle	Totale isolamenti
<i>C. jejuni</i>	16	3	19
<i>C. coli</i>	6	/	6
Tot.	22	3	25

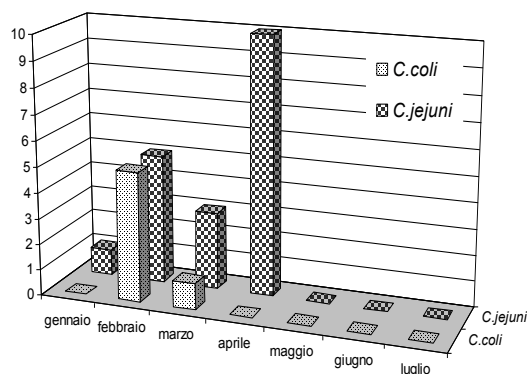
Tabella 2: Confronto fra SK, KA e PR.

Table 2: Comparison between SK,KA and PR.

N. ceppo	Terreno di isolamento		
	SK	KA	PR
1	+	+	+
2	+	-	+
3	-	-	+
4	-	-	+
5	-	-	+
6	-	+	+
7	-	-	+
8	+	-	+
9	-	-	+
10	+	+	+
11	+	+	-
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
17	-	-	+
18	+	+	+
19	-	+	+
20	-	+	+
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	+
24	-	-	+
25	-	-	+
Tot. isolamenti	14	15	24
1,2; 4,5; 8;10,12,14-25: <i>C. jejuni</i> 3,6,7,9,11,13: <i>C. coli</i>			

Figura 1: Isolamento di *Campylobacter spp.* nel periodo gennaio-luglio 2001

Figure1: Isolation of *Campylobacter spp* in the period January- July 2001.



COMUNICAZIONE 6

INDAGINE SULLO STATO SANITARIO DI UCCELLI SELVATICI CATTURATI NEL "PARCO NAZIONALE DEL CILENTO E VALLO DI DIANO"

A. Piccirillo¹, A. Baiano¹, L. Dipineto¹, L.F. Menna¹, M.Kalby², S. Troisi³, A. Fioretti¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviaria, Università di Napoli Federico II; ²Associazione Studi Ornitologici Italia Meridionale c/o Museo Naturalistico degli Alburni, Corleto Monforte (SA); ³Osservatorio Epidemiologico della Fauna Selvatica c/o Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano, Vallo della Lucania (SA).

Parole chiave: uccelli selvatici, stato sanitario, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.

Health monitoring of wild birds of the National Reserve of "Cilento and Vallo di Diano" (Italy)

Key words: wild birds, health status, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp.

Summary: Cloacal swabs, blood and faecal smears from 342 wild birds captured in the National Reserve of "Cilento and Vallo di Diano" in Campania Region (Italy) were tested in order to detect their health status and understand their potential role in spreading pathogens for humans and animals. In particular, we concentrated our attention on isolation of *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp. Clinical evaluation often exhibited ectoparasites (mites, ticks, lice, etc.). Two isolates of *Yersinia enterocolitica* were obtained at bacteriological examination, but *Salmonellas* were not found. The results of microscopic smears (blood and faeces) are not worthy. These results show a good health status of wild birds living in the Reserve and so they could not be a serious risk for other species health, humans included.

Correspondence: Alessandro Fioretti, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviaria, Università di Napoli Federico II, via F. Delpino, 1 - 80137 Napoli. E-mail: fioretti@unina.it

Introduzione

Il "Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano" (istituito con D.P.R. 5/6/95) ospita differenti specie di uccelli, appartenenti soprattutto all'ordine dei *Passeriformes*. Sono presenti, inoltre, Laridi, Corvidi ed alcune specie di Rapaci diurni e notturni (1). Gli esemplari presenti nel parco sono rappresentati prevalentemente da specie stanziali ed alcune migratrici. Gli spostamenti effettuati da queste ultime comprendono un territorio molto vasto, che si estende dalla zona sub-Sahariana fino al Nord Europa (5).

Gli uccelli durante le migrazioni potrebbero entrare in contatto con diversi agenti patogeni, rappresentando così un rischio di diffusione e contaminazione per altri animali, sia domestici che selvatici, e per l'uomo.

Nella presente indagine è stato effettuato un monitoraggio sullo stato sanitario degli uccelli selvatici ospitati all'interno del "Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano", ponendo particolare attenzione alla ricerca di *Salmonelle* e *Yersinie* al fine di poter ampliare le conoscenze relative alla diffusione di questi microrganismi nell'avifauna selvatica della nostra regione.

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta nell'ambito di un programma di inanellamento delle "Stazioni di Studio delle Migrazioni" attivate dal "Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano".

Catture: venivano eseguite nel comune di Pisciotta (SA), area della costa cilentana caratterizzata da colline costiere con uliveti secolari e macchia mediterranea, utilizzando reti "Mist Nets" (12 e 18 mt. di lunghezza x 3 mt. di altezza). L'attività veniva svolta ogni 2 settimane e per 2 giorni consecutivi (prima cattura 11-12/11/00, ultima 29-30/04/01). In totale sono stati catturati 342 esemplari, appartenenti a 34 differenti specie (tabella). Subito dopo la cattura si procedeva con il rilievo dei dati biometrici ed applicazione dell'anello identificativo.

Campionamenti: dopo aver esaminato clinicamente l'esemplare e prelevato una goccia di sangue (puntura alla vena alare con capillare) per l'allestimento di uno

striscio ematico, si procedeva con l'esecuzione del tampone cloacale, posto in apposito terreno per l'isolamento batterico. Successivamente il volatile veniva alloggiato in una piccola gabbia (9,5 x 13 cm.) dal fondo della quale, una volta avvenuta la defecazione, venivano raccolte le feci per ulteriori esami di laboratorio. Dopo aver effettuato i prelievi, l'esemplare era rimesso in libertà. Nella tabella è riportato il numero totale dei campioni eseguiti per specie. I tamponi cloacali erano destinati all'isolamento di *Salmonella* spp. e *Yersinia* spp., seguendo le metodiche consigliate dall'O.M.S. (1994). Dalle feci fresche veniva allestito uno striscio su vetrino, essiccato all'aria e colorato con il metodo di Gram per valutare la composizione batterica fecale. Lo striscio ematico, invece, era colorato con il metodo di Giemsa per individuare eventuali emoparassiti.

Risultati

Esame clinico: uno dei reperti di più frequente rilievo è stato la presenza di ectoparassiti (acari, pidocchi e zecche), che in alcuni casi avevano causato lesioni tali da determinare gravi deformazioni dei tessuti colpiti. Questi parassiti sono attualmente in corso di identificazione presso la Sezione di Parassitologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II. Fra gli altri reperti evidenziati all'esame clinico sono da segnalare: deformazione del becco da probabile evento traumatico, esiti cicatriziali di sospetta onfalite, presenza di formazioni simil-papillomatose a livello d'articolazione carpo-metacarpica destra, deformazione del metatarso da possibile frattura, ematoma congiuntivale da probabile evento traumatico.

Esame batteriologico: sono stati isolati due ceppi di *Yersinia enterocolitica* (uno da un esemplare di Lul piccolo e l'altro da una Cinciallegra), mentre l'isolamento di *Salmonella* spp. ha dato costantemente esito negativo.

Esame microscopico: dagli strisci di feci è risultata una prevalenza di Gram - (40-60, fino all'80%) nella flora microbica intestinale degli insettivori e di Gram + (70%) in quella dei granivori. Gli strisci ematici non

hanno evidenziato la presenza di emoparassiti.

Considerazioni e Conclusioni

Uno dei dati emersi dalla nostra indagine degno di nota è l'esito negativo degli esami batteriologici condotti per rilevare la presenza di Salmonella. Questo risultato si discosta notevolmente da quanto riportato in letteratura (3; 6) e ci induce a rivalutare il ruolo degli uccelli selvatici quali diffusori di tale microrganismo, almeno nel nostro territorio. Pertanto, essi potrebbero non rappresentare un reale pericolo per gli allevamenti avicoli, come temuto da numerosi altri AA. che li considerano, invece, importanti fonti d'infezione. Risulta ovvio, però, che tale ipotesi necessita di indagini più approfondite. E' nostra opinione, infine, che il mancato isolamento di Salmonella potrebbe anche essere ricondotto all'ambiente, in cui vivono le specie catturate, caratterizzato da un basso grado di urbanizzazione e nel quale anche gli insediamenti abitativi sono gestiti in maniera più attenta rispetto ad ambienti analoghi di aree non protette.

Gli isolamenti di *Yersinia enterocolitica*, invece, concordano con quanto già riportato da altri AA. (7), consentendoci così di confermare il ruolo che gli uccelli selvatici potrebbero avere come diffusori di questi enterobatteri, anch'essi di notevole rilevanza antropozoonosica (2). Anche i risultati degli esami microscopici eseguiti sugli strisci fecali confermano quanto già noto per gli uccelli tenuti in cattività (4). In questi volatili, in relazione alle abitudini alimentari, si nota una prevalenza di Gram + nelle feci di specie granivore (cardellini, verdoni, verzellini, ecc.) e Gram - nelle specie ad abitudini alimentari insettivore (pettirossi, merli, ecc.).

Concludendo, lo stato sanitario degli uccelli selvatici presenti nel "Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano", emerso nella presente indagine, risulta essere soddisfacente ed essi potrebbero non rappresentare un pericolo per la sanità pubblica ed animale. La realizzazione di un monitoraggio costante delle popolazioni di uccelli selvatici rimane un aspetto basilare della gestione faunistica e dovrebbe aumentare il suo valore epidemiologico, estendendosi ad ambiti geografici più ampi.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Sig.ra Pisa Fortuna per la valida collaborazione tecnica offerta.

Bibliografia

- 1) AAVV (1999). 2° Convegno Nazionale "Beni Ambientali e Beni Culturali del Cilento e Vallo di Diano", 21 Novembre 1998/22.23.24 Gennaio 1999, Vallo della Lucania (Salerno).
- 2) Butler T. (1998), Yersinosis and Plague. Zoonoses, Oxford University Press, New York (U.S.A.), 281-286.
- 3) Faddoul G.P., Fellow G.W., Baird J. (1965). A survey on the incidence of Salmonellae in wild birds. Avian Dis., 10, 89-94.
- 4) Harrison G.J., Ritchie B. W. (1994). Making Distinctions in The Physical Examination. Avian Medicine, Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida (USA), 151-156.
- 5) Jonsson L. (1996). Birds of Europe, A & C Black Ed., London (UK).
- 6) Menna L.F., Fioretti A., Conzo G., Fattori A., Grinberg A., Papparella V. (1994). Isolamento di enterobatteri da uccelli selvatici allo stato libero ed in cattività (1986-1992). Acta Med. Vet., 40, 21-30.
- 7) Sommariva M., Corona A., Grilli G., Fontana E., Gallazzi D. (2000). Ricerca di agenti zoonosici in uccelli selvatici e pollame rurale. La Selezione Veterinaria, 8-9, 771-781.

Tabella 1: Specie catturate e numero di campioni eseguiti

Table 1: Species captured and number of samples obtained

Specie	Esemplari catturati (N. tot.)	Tamponi cloacali(N. tot.)	Strisci ematici (N. totale)	Strisci fecali (N. totale)
Pettiroso (<i>Erithacus rubecula</i>)	115	115	64	51
Capinera (<i>Sylvia atricapilla</i>)	56	56	32	33
Merlo (<i>Turdus merula</i>)	28	28	14	12
Passera d'Italia (<i>Passer d. italiae</i>)	15	15	7	6
Tordo bottaccio (<i>Turdus philomelos</i>)	14	14	6	2
Cinciallegra (<i>Parus major</i>)	13	13	4	4
Cinciarella (<i>Parus caeruleus</i>)	13	13	1	1
Occhiocotto (<i>Sylvia melanocephala</i>)	12	12	4	4
Verzellino (<i>Serinus serinus</i>)	8	8	2	2
Quaglia (<i>Coturnix coturnix</i>)	8	8	-	-
Fringuello (<i>Fringilla coelebs</i>)	7	7	6	5
Lui piccolo (<i>Phylloscopus collybita</i>)	6	6	2	2
Passera scopaiola (<i>Prunella Modularis</i>)	5	5	4	4
Cardellino (<i>Carduelis carduelis</i>)	4	4	-	-
Zigolo nero (<i>Emberiza cirius</i>)	4	4	-	-
Verdone (<i>Carduelis chloris</i>)	3	3	1	-
Passera mattugia (<i>Passer montanus</i>)	3	3	2	2
Codibugnolo (<i>Aegithalos caudatus</i>)	3	3	1	1
Codiroso spazzacamino (<i>Phoenicurus ochruros</i>)	3	3	2	2
Sterpazzolina (<i>Sylvia cantillans</i>)	3	3	-	-
Usignolo di fiume (<i>Cettia cetti</i>)	3	3	1	1
Passero solitario (<i>Monticola solitarius</i>)	2	2	1	1
Beccafico (<i>Sylvia borin</i>)	2	2	-	-
Torcicollo (<i>Jynx torquilla</i>)	2	2	1	1
Balia nera (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	1	1	-	-
Pigliamosche (<i>Muscicapa striata</i>)	1	1	-	-
Rondine (<i>Hirundo rustica</i>)	1	1	-	-
Gazza (<i>Pica pica</i>)	1	1	-	-

Civetta (<i>Athene noctua</i>)	1	1	-	-
Tortora (<i>Streptopelia turtur</i>)	1	1	-	-
Sterpazzola (<i>Sylvia communis</i>)	1	1	-	-
Tordela (<i>Turdus viscivorus</i>)	1	1	-	-
Picchio muratore (<i>Sitta europaea</i>)	1	1	-	-
Forapaglie (<i>Ocrocephalus schoenobaenus</i>)	1	1	-	-

COMUNICAZIONE 7

INDAGINE SULLA PRESENZA DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (PBF) IN ALLEVAMENTI ITALIANI

E. Bert, S. Cerruti Sola

Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

Parole chiave: malattia del becco e delle penne (PBF), pappagalli, polymerase chain reaction

Survey on the incidence of Psittacine Beak and Feather Disease in Italian aviaries

Key Words: psittacine beak and feather disease, psittacine birds, polymerase chain reaction

Summary: The presence of Psittacine Beak and Feather Disease (PBF) in Italian aviaries has been evaluated. 478 parrots derived from 14 different aviaries have been tested. The diagnosis was performed using a PCR assay which had been optimized in our laboratory. PBF was found in 7.11% of the birds tested. This high percentage is close to values found in other countries.

Correspondence: Bert Elena, 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 una patologia ad andamento acuto nei soggetti giovani e cronico negli adulti. Determina distrofia e perdita delle penne, accrescimento anormale del becco con fratture e necrosi del palato. L'esito della malattia è quasi sempre infausto a causa dell'azione immunosoppressiva del virus (1,4). La PBF è sostenuta da un virus appartenente alla famiglia *Circoviridae* (4). Tra le diverse tecniche diagnostiche, quali biopsia dell'epitelio dei follicoli e ricerca di corpi inclusi, emoagglutinazione e inibizione dell'emoagglutinazione, ibridazione *in situ* (2,3,5), il metodo che offre maggior sensibilità e specificità per la diagnosi della PBF è rappresentato, secondo alcuni autori (1,4), dalla ricerca del DNA virale tramite la PCR (*polymerase chain reaction*).

L'obiettivo di questo lavoro era di valutare la presenza della malattia del becco e delle penne degli psittacidi (PBF) in Italia.

Materiali e Metodi

Uccelli. Sono stati eseguiti esami da campioni di 28 pappagalli morti e 450 pappagalli vivi provenienti da 14 allevamenti italiani.

Campioni. Sui soggetti morti veniva effettuata l'autopsia. Sugli organi venivano eseguiti esami istologici per la ricerca di eventuali corpi inclusi e l'ibridazione *in situ*. Dal fegato e dalla milza venivano prelevati campioni per l'estrazione del DNA. Ad ogni pappagallo vivo veniva prelevato sangue (da 0.3 a 0.8 cc) dalla vena giugulare e conservato in litio eparina.

Estrazione del DNA virale e amplificazione. Veniva eseguita l'estrazione del DNA virale sia dal sangue intero sia dalle penne e dagli organi. Per l'estrazione è stato usato il *Wizard genomic DNA purification kit* (*Promega-USA*).

Amplificazione. Per l'amplificazione sono stati utilizzati i primers pubblicati da Ypelaar (5). Primer senso: AACCTACAGACGGCGAG, primer antisense: GTACAAGGAGGACTGTGAC che amplificano una porzione dell'ORF1 di 717 paia di basi. La reazione di amplificazione avveniva alle seguenti temperature: *melting* 94°C per 30 secondi, *annealing* 60°C per 30 secondi, *extension* 72°C per 1 minuto, per 32 cicli. Gli amplificati venivano fatti correre in elettroforesi su gel di agarosio al 2% e colorati in bromuro di etidio.

Risultati e Discussione

I 478 pappagalli testati appartenevano a 42 specie: 205 soggetti tra le specie del "Nuovo mondo" (Centro e Sud America) e 273 tra quelle del "Vecchio mondo" (Africa e Asia-Oceania). 28 uccelli erano di cattura e importazione mentre gli altri erano allevati in Italia. 263 pappagalli erano adulti e 215 erano giovani tra i tre e i sei mesi di vita. Su 478 pappagalli testati, 34 sono risultati positivi alla ricerca del virus della PBF. I soggetti pervenuti morti erano negativi sia alla PCR sia all'ibridazione *in situ*. Tra i pappagalli positivi, 6 mostravano caratteristici sintomi clinici, quali distrofia delle penne e lesioni al becco, mentre gli altri erano asintomatici. Soltanto due pappagalli positivi erano di cattura (uno proveniva dalla Papua Nuova Guinea e l'altro dal Camerun, importato dal Belgio), gli altri 32 erano allevati in Italia e provenivano da 9 differenti allevamenti. Di questi pappagalli positivi, 10 erano adulti e 24 erano giovani; 9 appartenevano a specie originarie del Nuovo mondo e 25 a specie del Vecchio mondo (Tabella 1).

Nell'allevamento dove vi era la maggior parte dei soggetti positivi (n = 14), sono stati fatti prelievi ambientali in 5 zone. Due prelievi di piumino provenienti dalla *nursery* hanno dato esito positivo alla ricerca del virus con PCR. Negli allevamenti italiani presi in esame nel nostro studio la PBF è presente con un 7,1% di positività; il risultato è leggermente più

alto di quello evidenziato da Dalhausen (1) che in un campionamento comunque molto più ampio del nostro, aveva trovato un 5% di positività. Come già rilevato da Dalhausen (1) e da Ritchie (4) è stata evidenziata una maggior incidenza di soggetti positivi (9,2%) nelle specie originarie del Vecchio mondo, rispetto ai positivi (4,3%) delle specie del Nuovo mondo. L'11,4% dei soggetti giovani testati è risultato positivo, mentre per gli adulti la percentuale era soltanto del 4,2%. Questo dato conferma che i soggetti giovani sono i più sensibili alla PBFD. Benché sia ipotizzata la trasmissione verticale del virus (4), la contaminazione ambientale è considerata la principale fonte d'infezione (5). La presenza del virus nei campioni ambientali da noi esaminati e l'esito negativo della ricerca del virus nei riproduttori dell'allevamento preso in esame, ci fa presupporre che l'infezione dei giovani pappagalli sia avvenuta per via orizzontale, per contaminazione ambientale. E' d'uso corrente allevare nella stessa *nursery* pulli provenienti da diversi allevamenti; tale abitudine può essere rischiosa poiché può favorire la diffusione della malattia. La maggior parte dei pappagalli positivi non presentava sintomatologia. Tali portatori sani, così come sottolineato da diversi autori (1,4), possono essere una causa importante di contaminazione ambientale. In questa prima fase dell'indagine epidemiologica della PBFD si hanno pochi dati sui soggetti importati. Si ritiene invece importante prevedere un monitoraggio di tali soggetti per prevenire la diffusione della patologia; così come effettuare un monitoraggio sui riproduttori presenti negli allevamenti quali soggetti potenzialmente eliminatori; consigliare severe misure di biosicurezza negli allevamenti per preservare i pulli dall'infezione.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. Antonio Ramis della Universitat Autònoma de Barcelona, Dipartimento Patologia Animale, per aver eseguito gli esami di *ibridazione in situ*.

Bibliografia

1. Dalhausen M.S., Radabaugh M.S. (1997). Update on Psittacine Beak and Feather Disease and Avian Polyomavirus – epidemiology and diagnostics. Proceedings of the MASA Conference, 51-57.

2. Raidal S.S., Sabine M., Cross G.M. (1993). Laboratory diagnosis of psittacine beak and feather disease by haemagglutination and haemagglutination inhibition. Aust. Vet. J., 70:133-137.
3. Ramis A., Latimer K.S., Niagro F.D., Campagnoli R.P., Ritchie B.W., Pesti D. (1994). Diagnosis of Psittacine beak and feather disease (PBFD) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psittacine tissues using DNA *in situ* hybridization. Avian Path., 23:643-657.
4. Ritchie B.W., Carter K. (1995). Psittacine beak and feather disease in Avian viruses: function and control. Wings publishing inc., Florida, USA, 223-251.
5. Ypelaar I., Bassami M.R., Wilcox G.E., Raidal S.R. (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. Vet. Micro., 68:141-148.

Tabella 1: Numero di individui per specie risultati positivi alla PBFD

Table 1: Number of individual for each species tested positive

Genere	Specie	N°
Specie originarie del "Nuovo mondo"		9
<i>Amazona</i>	<i>aestiva</i>	1
<i>Amazona</i>	<i>albifrons</i>	2
<i>Amazona</i>	<i>ochrocephala</i>	2
<i>Aratinga</i>	<i>acuticaudata</i>	2
<i>Cyanoliseus</i>	<i>patagonus</i>	2
Specie originarie del "Vecchio mondo"		25
<i>Agapornis</i>	<i>fischeri</i>	2
<i>Agapornis</i>	<i>roseicollis</i>	2
<i>Cacatua</i>	<i>galerita</i>	2
<i>Cacatua</i>	<i>sulphurea</i>	4
<i>Cacatua</i>	<i>ophthalmica</i>	2
<i>Eclactus</i>	<i>roratus</i>	1
<i>Melopsittacus</i>	<i>undulatus</i>	1
<i>Poicephalus</i>	<i>rufiventris</i>	2
<i>Polytelis</i>	<i>anthopeplus</i>	2
<i>Psittacula</i>	<i>eupatria</i>	1
<i>Psittacula</i>	<i>krameri</i>	3
<i>Psittacus</i>	<i>erithacus</i>	3

COMUNICAZIONE 8**RICERCHE ED OSSERVAZIONI SULLO STATO SANITARIO DEI COLOMBI DELLA CITTÀ DI PALO DEL COLLE (BARI) – RISULTATI PRELIMINARI****A. Camarda, D. Pennelli, E. Circella., V. Ficarella, D. Di Modugno, G. Di Modugno***Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Sezione di Patologia Aviaria, Università degli Studi di Bari.*Parole chiave: Colombi di città, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, zoonosi, sanità pubblica**Researches and observations on health status of pigeons living in Palo del Colle. Preliminary results**Key words: pigeon, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, zoonosis, public health

Summary: During winter 1999-2000, researches on density and sanitary status of the population of pigeons placed in Palo del Colle (Bari), were carried out. The census of the birds, taken in the centre of the town, supplied an objective estimation of the high number of pigeons and the subsequent information on the overcrowding of the animal population.

Bacteriological investigations revealed the presence of *Salmonella spp.* and *Campylobacter jejuni*, respectively in the percentage of 7.11% and 14.3%. Moreover the birds were infested with *Pseudolynchia canariensis*, which is responsible for the transmission of *Haemoproteus columbae*, an hemoparasite found in all the n.40 prepared blood smears.

The results of this preliminary researches put in evidence the bad environmental and sanitary conditions in the considered zone. In fact it is proved that urban pigeons found in Palo del Colle excellent hospitality conditions, which permitted an excessive increase of birds population.

Correspondence: prof. Antonio Camarda, Dipartimento di Sanità e Benessere degli animali, Sezione di Patologia Aviaria, Facoltà di Medicina Veterinaria Università degli Studi di Bari - S.P. per Casamassima Km3, 70010 Valenzano (Ba) a.camarda@veterinaria-j.uniba.it

Introduzione

Nella seconda metà di questo secolo si è assistito, soprattutto nelle città dell'Europa continentale, ad un aumento esponenziale del numero di varie specie volatili sinantropiche. Il colombo di città è stato individuato fra quelle che destano maggiori preoccupazioni (4). I danni arrecati dalle popolazioni di volatili sono tanto più gravi quanto maggiore è il numero di animali inurbati, divenendo intollerabili e suscitando dunque, allarmismo e proteste da parte della cittadinanza. Gli inconvenienti provocati sono di varia natura ed inquadrabili in disagi ai cittadini, rischi sanitari e danni ambientali, in particolare al patrimonio architettonico e monumentale dell'abitato (2).

In tale contesto, abbiamo effettuato ricerche sulle popolazioni di colombi presenti nel Comune di Palo del Colle, al fine di valutarne la consistenza numerica, il loro stato sanitario e gli eventuali rischi di Sanità Pubblica correlati.

Materiali e metodi

Dopo vari sopralluoghi nei distretti dell'area cittadina, tenuto conto della struttura urbanistica dell'abitato, si è proceduto alla individuazione ed alla perimetrazione di una superficie tipo, indicativa ai fini delle ricerche da effettuare. L'area circoscrive un settore del centro storico cittadino e comprende edifici di rilevante valore artistico-culturale; è ancora densamente popolata da residenti ed inoltre, per la presenza di svariati uffici pubblici, costituisce motivo di notevole affluenza quotidiana di cittadini, rendendo quindi intensa l'interazione tra la popolazione umana e quella dei volatili. Per il censimento, compiuto fra il 22 Novembre 1999 ed il 19 Febbraio 2000, si è utilizzato il "Metodo delle strade", effettuando per la conta otto sopralluoghi, rispettivamente nelle prime ore del mattino ed al tramonto.

I campionamenti per gli esami di laboratorio, compiuti con cadenza settimanale per n.7 ripetizioni, hanno riguardato, in siti diversi, la cattura di soggetti vivi, la raccolta di carcasse rinvenute sul manto stradale,

nonché prelievi di feci, uova e nidi. In totale sono stati esaminati n.239 campioni.

Ciascun animale è stato sottoposto ad un accurato esame clinico, a prelievo di feci mediante tamponi cloacali ed a prelievi di sangue. Sono stati allestiti n.40 strisci ematici su vetrino per la ricerca di emoprotozoi; fissazione in metanolo (100%), colorazione secondo il metodo "Giemsa" (7).

Sulle carcasse rinvenute nell'abitato e sui soggetti defedati o con sintomatologia evidente, poi sacrificati, sono state effettuate indagini necroscopiche al tavolo anatomico.

Gli esami batteriologici e sierologici hanno riguardato la ricerca di alcuni agenti infettivi causa di zoonosi, ritenuti indicativi del potenziale rischio sanitario rappresentato dalle popolazioni di colombi esaminate. La ricerca di *Salmonella spp.* e *Campylobacter jejuni*, sia dagli animali che da guano, nidi e uova, è stata effettuata secondo metodiche da noi già descritte (5,6).

La ricerca di anticorpi anti-chlamydia, è stata effettuata utilizzando la tecnica di Fissazione del Complemento (FdC), su un totale di n.59 sieri, mentre gli anticorpi anti-Newcastle disease, su un totale di n.108 sieri, sono stati determinati mediante la tecnica di Inibizione della Emoagglutinazione (HI), utilizzando 4 UHA - ceppo La Sota.

Risultati

Il censimento effettuato, ha rilevato una densità di volatili pari a 366,7 colombi per ettaro. Gli esami batteriologici, effettuati su un totale di n.239 campioni, hanno consentito l'isolamento di *Salmonella spp.* e *Campylobacter jejuni* rispettivamente in percentuali del 7,11% e 14.3%. In particolare, *Salmonella spp.* è stata isolata da n.14 dei n.159 soggetti vivi esaminati (8,80%) e da n.1 delle n.19 carcasse raccolte (5,26%), mentre per *Campylobacter jejuni* è stata riscontrata una percentuale di positività del 16.8% nei colombi vivi e del 77.7% nelle carcasse. Le Salmonelle erano presenti, inoltre, nel 2,70% dei campioni di guano esaminati e nel 12,5% dei nidi

prelevati; tutti i pool di uova esaminati sono invece risultati costantemente negativi.

Come atteso invece, i campioni di guano, uova e nidi, saggiati per la ricerca di *Campylobacter jejuni*, sono risultati costantemente negativi.

La sierotipizzazione ha consentito l'evidenziazione di *Salmonella tiphymurium* nella percentuale del 50% dei ceppi isolati, *Salmonella Gloucester* nella percentuale del 37.5, *Salmonella livingstone* e *wingstone* entrambe in quella del 6.25%.

Le indagini sierologiche hanno evidenziato la presenza di anticorpi anti-Chlamydia, a titoli considerati positivi per avvenuta infezione ($\geq 1:16$), in n.30 dei n.59 campioni esaminati. Soltanto n.3 sieri hanno denunciato un titolo pari a 1:128. Di notevole interesse, alle prove di Inibizione della Emoagglutinazione (HI) nei confronti del virus della Pseudopeste Aviaria, il riscontro di n. 10 sieri (9,25%) aventi un titolo pari o superiore ad 1:64 (vedi tabella 1).

In tutti gli strisci ematici esaminati (n° 40), è stata riscontrata la presenza costante di *Haemoproteus columbae*.

Nel corso degli esami clinici si è evidenziata la presenza di *Pseudolinchia canariensis* nella totalità dei soggetti esaminati (100%). In alcuni casi è stato possibile individuare anche fino a 5 ditteri infestanti un singolo ospite. Tali ditteri, oltre a rendersi responsabili di una fastidiosa azione di disturbo, sono sicuramente da ritenere responsabili della trasmissione ai colombi di città degli emoprotozoi riscontrati. È stata ormai dimostrata la stretta correlazione esistente fra la circolazione, nell'ambito delle colonie, del dittero citato e la prevalenza in esse di emoparassiti, nel caso specifico di *Haemoproteus columbae* (3).

Non è mai stata rilevata la presenza di zecche, considerata anche la stagione fredda, nel corso della quale si è proceduto all'esame degli animali.

Discussione

Le operazioni di censimento effettuate, hanno offerto un'obiettiva stima della eccessiva consistenza numerica dei colombi nell'area esaminata e la conseguente indicazione dello stato di sovraffollamento della popolazione animale, causa del degrado sanitario urbano. L'elevato numero di colombi da noi censito è notevolmente superiore al valore ritenuto accettabile da alcuni autori (300-400 soggetti per 100 Ha) (1,2).

Gli esami di laboratorio effettuati, hanno messo in risalto la presenza di microrganismi patogeni trasmissibili all'uomo.

Il sovraffollamento evidenziato, ha presumibilmente comportato una rapida propagazione tra i soggetti degli agenti patogeni citati. Tra questi, sono stati riscontrati, ad esempio, individui portatori sani ma eliminatori di *Salmonella*, soggetti ammalati ed altri deceduti che presentavano lesioni anatomo-patologiche e riscontri batteriologici, che dimostravano la morte per l'infezione.

Le carcasse raccolte nel corso delle indagini sul selciato stradale, hanno evidenziato chiaramente di essere state oggetto di alimentazione da parte di ratti o altri animali, come cani o gatti. Non si può escludere, pertanto, che dette carcasse abbiano costituito motivo di incremento degli anelli di una catena epidemiologica, la quale perpetua nell'abitato la

presenza dei microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo. Tale rischio è risultato ancora più rilevante in alcuni siti critici, presenti nell'area oggetto delle ricerche; luoghi ad alto richiamo ed incontro di cittadini, con diversa sensibilità agli agenti patogeni. Non si può escludere, infatti, che tra la popolazione urbana siano presenti bambini, anziani, ed individui immunodepressi e quindi con carenze nella risposta immunitaria agli agenti infettivi, peraltro riscontrati nel corso delle nostre ricerche.

Non va sottaciuto, infine, che la polverulenza derivante dalle deiezioni essiccate (guano), dal piumino e dal materiale costituente i nidi, come da noi evidenziato, può rappresentare serbatoio, oltre che di agenti zoonosici, anche di allergeni, notoriamente pericolosi per soggetti predisposti a forme allergiche.

In conclusione, si rendono indispensabili interventi di risanamento nell'area cittadina oggetto delle ricerche. Si sottolinea la necessità di operare con una strategia articolata, finalizzata non solo al contenimento numerico delle popolazioni di colombi, ma anche alla bonifica ambientale ed alla eliminazione dei fattori che facilitano la colonizzazione animale, ben consci che un singolo intervento da solo non può essere considerato risolutivo.

Tabella 1: Titoli anticorpali anti-Chlamydia (FdC) ed anti-Newcastle disease virus (PMV-1) in colombi catturati nel Comune di Palo del Colle.

Table 1: Anti-Chlamydia (FdC) and anti-Newcastle disease virus (PMV-1) antibody titres in pigeons captured in Palo del Colle.

Titolo	Ab anti-Chlamydia		Ab anti-NDV	
	Nr. Sieri	%	Nr. Sieri	%
$\leq 1:16$	29	49,15	55	50,91
1:16	3	5,08	31	28,70
1:32	13	22,03	12	11,11
1:64	11	18,64	9	8,33
1:128	3	5,08	1	0,92

Bibliografia

- Baldaccini N.E. (1988). "Valutazione della consistenza e possibilità di controllo in popolazioni urbane di uccelli". IV Simposio sulla Difesa Antiparassitaria nelle Industrie Alimentari e sulla Protezione degli Alimenti. Università Cattolica, Piacenza.
- Ballarini G., Baldaccini N. E., Pezza F. (1989). "Colombi in città. Aspetti biologici, sanitari e giuridici. Metodologie di controllo". Istituto Nazionale di Biologia della Selvaggina "Alessandro Ghigi". pp 7-15; 25-38.
- Bennett G.F.; Pierce M.A. (1990). "The haemoproteid parasites of the pigeons and doves (Columbidae)". Journal of Natural History 24, 311-325.
- Brussino A. (1999). "Gli uccelli sinantropici". In "Come gestire l'igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche". Volume III. SBM ed., Parma. pp 211-220.
- Di Modugno G.; Nasti R.; Camarda A.; Circella E. (2000). "Tipizzazione e antibiotico resistenza di *Campylobacter jejuni* isolati da contenuto intestinale, ovidutto e guscio di uova da consumo". Sel. Vet. 8/9, 741-750.
- Di Modugno G.; Ricci M.; Camarda A. (1992). "Ricerche sulla presenza di *Salmonella enteritidis* e di altre salmonelle mobili in allevamenti di ovaiole della Puglia". Atti del Convegno Nazionale "Parliamo di ...carni avicole e cunicole", 121-133.
- Mikaelian, I., Bayol, P. (1991). "Hemoprotozoaires chez le rapaces en rehabilitation". Le Point Vet. 22, 69-72.

COMUNICAZIONE 9

CLONAZIONE E SEQUENZIAMENTO DELL'ORF 1 DEL VIRUS DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (PBFVDV)

E. Bert, E. Grego, S. Cerruti Sola

Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

Parole chiave: virus della malattia del becco e delle penne (PBFVDV), pappagalli, clonazione, sequenze

Cloning and sequencing of the ORF1 of Psittacine Beak and Feather Disease Virus (PBFVDV)

Key Words: psittacine beak and feather disease, psittacine birds, polymerase chain reaction

Summary: In order to obtain more details about presence and diffusion of PBFVDV in Italy, we tested 7 sequences of the PBFVDV ORF1. We cloned and sequenced 7 PCR products of 717 pb. The positive birds were from 7 different species; 6 were born in Italy, 1 was born in New Guinea. The sequences analysis showed that PBFVDV has an high mutation rate. The PBFVDV viruses from Italian psittacines are similar while the virus from the New Guinea parrot is different.

Correspondence: Bert Elena, 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 una patologia ad eziologia virale, scoperta negli anni settanta in Australia e attualmente diffusa negli allevamenti di pappagalli in USA e Europa (2). La PBFVD è presente solo nei pappagalli e colpisce oltre 40 specie differenti (4). Il virus appartiene alla famiglia Circoviridae, ed ha un diametro di 14-20 nm. Il genoma completo di due isolati del PBFVDV è stato sequenziato e pubblicato. E' un virus a DNA, a catena singola e circolare di 1993 paia di basi (1,3). Tra le diverse tecniche diagnostiche, il metodo che offre maggior sensibilità e specificità per la diagnosi della PBFVD, secondo alcuni autori (2,4) è rappresentato dalla ricerca del DNA virale tramite la PCR (*polymerase chain reaction*).

In Italia la malattia del becco e delle penne è presente e la sua incidenza è stata stimata essere circa del 7% (6).

Con questo lavoro si è voluto ottenere dati più approfonditi sulla presenza del PBFVDV in Italia attraverso l'analisi di 7 sequenze di parte del genoma del virus, con l'obiettivo di mettere a punto, in un secondo tempo, un test ELISA per la ricerca del Circovirus dei pappagalli. Infatti un test sierologico sarebbe più pratico e più economico rispetto alla PCR.

Materiali e metodi

Campioni. Sono stati scelti 7 prodotti di amplificazione di campioni risultati positivi alla ricerca del Circovirus. La scelta è stata effettuata sia in base alla provenienza e alla specie degli uccelli da cui era derivato il DNA, sia in base alla qualità dell'amplificato. Il DNA proveniva da 6 pappagalli di differenti specie, nati in Italia in 6 diversi allevamenti, e da 1 pappagallo importato dalla Nuova Guinea.

Clonazione. Dopo purificazione degli amplificati con il metodo *QIAquick PCR purification Kit (Qiagen-USA)*, veniva eseguita la ligasi con il vettore pUC18 *SmaI/BAP* utilizzando il *Sure Clone Ligation kit (Pharmacia Biotech - USA)*. La trasformazione veniva fatta in cellule competenti (*E. coli*) che permettevano di effettuare lo *screening* "bianco-blu" delle colonie in presenza di XGAL e IPTG.

Sequenziamento. Venivano verificate le colonie positive con una PCR e, dopo estrazione del DNA da

plasmide, veniva effettuata la reazione di *cycle sequencing* nel *Termal Cycler Cetus 2400 (Abiprism-USA)*. Dopo purificazione della reazione e denaturazione, si eseguiva il sequenziamento nel sequenziatore *ABI Prism 310 (USA)*. *Analisi delle sequenze.* Dopo aver verificato e corretto le sequenze con il programma *Chromas2*, si analizzavano con *ClustalX*, e *Mega* e la filogenesi veniva fatta con il metodo *Neighbor Joining*, e con la matrice *Tamura-nei*. Veniva infine eseguita una verifica con il test *Bootstrap*.

Risultati e Discussione

Dai 7 prodotti di amplificazione iniziali, è stato possibile ottenere le sequenze dell'ORF1 del PBFVDV, che consistevano di 717 paia di basi. Le sequenze ottenute provenivano da campioni di sangue prelevati nei soggetti descritti in tabella 1.

Tabella 1: Specie da cui sono stati prelevati i campioni di sangue

Table 1: Species from which blood samples were taken

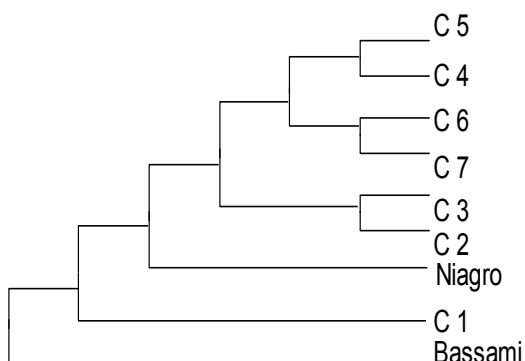
Specie	Origine	Clone
<i>Cacatua ophthalmica</i>	Nuova Guinea	C 1
<i>Agapornis spp.</i>	Allevam. 1	C 2
<i>Amazona albifrons</i>	Allevam. 2	C 3
<i>Cacatua sulphurea</i>	Allevam. 3	C 4
<i>Cacatua sulphurea</i>	Allevam. 4	C 5
<i>Poicephalus rufiventris</i>	Allevam. 5	C 6
<i>Melopsittacus undulatus</i>	Allevam. 6	C 7

Le sequenze di riferimento scelte erano due: una pubblicata da Niagro (3), di un virus proveniente da un pappagallo nato in cattività in USA e l'altra pubblicata da Bassami (1), sequenza di DNA virale estratto da un pappagallo selvatico dell'Australia. L'analisi delle sequenze ha permesso di individuare una notevole variabilità del tratto di genoma dei Circovirus studiati. E' molto alto il tasso di mutazioni, molte delle quali

sono non sinonime e determinano quindi variazioni nella composizione degli aminoacidi.

Figura 1: Filogenesi dei Circovirus della PBF D sequenziati in Italia

Figure 1: Phylogenetic tree of PFB D Circovirus isolated in Italy



L'analisi dell'albero filogenetico ha messo in evidenza una netta distanza tra i cloni derivanti da campioni di uccelli nati in cattività e tra quelli di uccelli selvatici. Come si vede in figura 1, il clone 1, originario della Nuova Guinea, è collegato a quello di riferimento proveniente dall'Australia. La distanza tra il clone australiano e gli altri mette in evidenza che si tratti di un ceppo vecchio da cui derivano gli altri, ciò confermerebbe l'ipotesi che i Circovirus siano originari dell'Australia e si siano successivamente diffusi in USA e Europa, con il commercio dei pappagalli.

Il raggruppamento dei ceppi provenienti dai soggetti nati in cattività in Italia dimostra che questi sono più vicini al ceppo di riferimento americano, proveniente anche questo da un soggetto nato in cattività. Non ci sono significative differenze legate alla specie di pappagallo, come avevano già evidenziato Bassami (1) e Ypelaar (5). I ceppi italiani sono tutti vicini tra loro. Come si può osservare, i cloni sono raggruppati a coppie, ma non si conosce una spiegazione di ciò, poiché i campioni provengono da allevamenti diversi e geograficamente distanti tra loro. Si sa che nella pratica dell'allevamento dei pappagalli, avvengono spostamenti di uccelli da un allevamento all'altro,

questo favorirebbe la diffusione del virus e spiegherebbe perché alcuni ceppi sono vicini tra loro.

L'elevata variabilità del virus mette in guardia su eventuali problemi che potrebbero verificarsi in futuro: come accade nella diagnosi di altre patologie ad eziologia virale, tecniche diagnostiche quali l'ELISA messe a punto su un determinato ceppo virale possono essere inefficaci qualora il ceppo virale sia differente. È interessante osservare come uccelli importati da Paesi in cui la patologia è endemica, possano portare con sé ceppi del virus diversi da quelli già presenti in Italia, così come è avvenuto per il campione C1. Questo è un altro elemento che dovrà essere considerato nella messa a punto di eventuali metodi diagnostici. Sarà quindi necessario proseguire nello studio delle sequenze dei Circovirus degli psittacidi rilevati in Italia, per poter lavorare su nuove tecniche diagnostiche. Sarebbe inoltre auspicabile la creazione di veri e propri centri di quarantena degli uccelli importati, dove effettuare controlli sanitari al fine di prevenire la diffusione del Circovirus in allevamenti italiani.

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 circoviruses and chicken anaemia virus. *Virology*, 249, 453-459.
2. Dalhausen M.S., Radabaugh M.S., (1997). Update on Psittacine Beak and Feather Disease and Avian Polyomavirus – epidemiology and diagnostics. *Proceedings of the MASAAV Conference*, 51-57.
3. Niagro F.D., Forsthoefel A.N., Lawther R.P., Kamalanathan L., Ritchie B.W., Latimer K.S., Lukert P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediate between geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Of Virology*, 143, 1723-1744.
4. Todd D., (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology*, 29, 373-394.
5. Ypelaar I., Bassami M.R., Wilcox G.E., Raidal S.R. (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Veterinary Microbiology*, 68:141-148.
6. Bert E., Cerruti Sola S. (2001). Indagine sulla presenza della Malattia del becco e delle penne degli psittacidi (PBF D) in allevamenti italiani. *Congresso SIPA, Forlì, questo volume*.

COMUNICAZIONE 10

RICERCHE SULLA SOPRAVVIVENZA DI *C. JEJUNI* SUL GUSCIO DI UOVA DA CONSUMO. REPLICAZIONE DEL GERME NEL CONTENUTO DI UOVA INFETTATE SPERIMENTALMENTE

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

Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Sezione di patologia Aviaria, Università degli Studi di Bari

Parole chiave: *Campylobacter jejuni*, uova, tossinfezioni alimentari.

Survival of *Campylobacter jejuni* on the eggshell. Growth in albumen and yolk of table eggs experimentally contaminated

Key words: *Campylobacter jejuni*, eggs, food poisoning

Summary: The presence of *Campylobacter jejuni* on the eggshell experimentally contaminated and kept at 20-25°C and 4°C, and the ability of the microorganism to penetrate, survive and grow in the albumen and yolk, was verified. *Campylobacter jejuni* was recovered nearly from 100% of the eggshells after 30' from infection. The shells contamination decreased faster in the samples kept at environmental temperature than at 4°C. *Campylobacter jejuni* was rarely recovered after 36 hours both from eggshells refrigerated and placed at 20-25°C. The detection of *Campylobacter jejuni* in the albumen and yolk was sporadic. The *Campylobacter jejuni* counts decreased by about 5 log₁₀ CFU/ml in the white experimentally contaminated (10¹⁰ FCU/ml) and refrigerated or kept at environmental temperature within 48 hours. *Campylobacter jejuni* was recovered in the albumen until 9 days after the experimental contamination. In the yolk (10¹⁰ CFU/ml) the number of inoculated *Campylobacter* decreased more slowly. At 4°C the bacteria survived for 25 days, while at 20-25°C was still detected after 22 days.

Correspondence: prof. G. Di Modugno, Dip. di Sanità e Benessere degli Animali, Sez. Patologia Aviaria Fac. Medicina Veterinaria - S.P. per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano (Bari - Italia) e-mail: g.dimodugno@veterinaria-j.uniba.it

Introduzione

Le tossinfezioni alimentari da *Campylobacter jejuni* vengono segnalate con frequenza sempre maggiore (1). Principale serbatoio del germe è considerato il pollame, dal quale il *Campylobacter (C.) jejuni* è isolato dall'apparato gastroenterico e dalle carcasse (1, 3). Precedenti nostre ricerche (2) effettuate in allevamenti commerciali hanno evidenziato che *Campylobacter jejuni* può riscontrarsi con notevole frequenza anche nell'apparato riproduttore di galline ovaiole in deposizione, nonché sul guscio delle uova deposte (in percentuale variabile dal 2,5% al 22,2% in relazione al grado di imbrattamento del guscio). Resta ancora poco chiaro il ruolo svolto dalle uova nella epidemiologia della trasmissione dell'infezione all'uomo. Si è inteso, pertanto, verificare la sopravvivenza del *Campylobacter jejuni* sul guscio di uova infettate sperimentalmente nonché la sua capacità di penetrazione attraverso i pori e di contaminazione del contenuto dell'uovo. È stata altresì valutata la capacità di replicazione del germe in albume e tuorlo infettati sperimentalmente e tenuti in diverse condizioni di temperatura.

Materiali e metodi

Infezione sperimentale delle uova. N.330 uova, a circa 3 ore dalla deposizione, sono state infettate sperimentalmente con una sospensione contenente *Campylobacter jejuni* alla concentrazione di 1x10⁶ UFC/ml. Le uova sono state inizialmente distinte in due gruppi e contaminate, quelle del primo gruppo mediante immersione per 1 minuto e quelle del secondo mediante immersione per 15 minuti nella predetta sospensione. Successivamente sono state suddivise in ulteriori 2 aliquote, la prima tenuta a temperatura ambiente (20-25°C) e la seconda a 4°C. Sono stati effettuati tentativi di reisolare il germe dal guscio e dal contenuto (albume e tuorlo separatamente) a 0,5,3,6,12,24 e 36 ore dall'infezione. Per ciascuna prova sono state effettuate n.5 ripetizioni di 5 uova ciascuna, eccetto che per il tentativo di reisolamento a 36 ore effettuato per sole 2 ripetizioni

se l'immersione delle uova nella sospensione batterica durava 1 minuto; una sola ripetizione è stata effettuata, agli intervalli di tempo indicati, se l'immersione si prolungava per 15 minuti.

Infezione sperimentale di albume e tuorlo. Sono state utilizzate per la sperimentazione uova a circa 3 ore dalla deposizione. In laboratorio, il guscio è stato lavato e disinfettato con etanolo, quindi è stato rotto, ed il contenuto è stato separato e versato asetticamente in contenitori sterili. Sono stati allestiti due pool di 80 ml rispettivamente di albume e di tuorlo, infettati con una sospensione di *Campylobacter jejuni* e suddivisi in due ulteriori aliquote di 40 ml ciascuna, rispettivamente stoccate a 4°C e a temperatura ambiente (20-25°C). I 4 campioni ottenuti evidenziavano alla conta batterica una carica di 10¹⁰ UFC/ml del germe. Da ciascun campione, ogni 24 ore, è stato isolato il *Campylobacter jejuni* e valutato il titolo con il metodo del Minimo Numero Probabile (MPN) (6). Le metodiche di isolamento, coltivazione ed identificazione del *Campylobacter* utilizzate sono state precedentemente descritte (2).

Risultati

C. jejuni è stato isolato dopo 30 minuti dal guscio di quasi tutte le uova tenute rispettivamente a temperatura ambiente ed a 4°C. Già a 12 ore dall'infezione, la probabilità di reisolare il germe dal guscio delle uova tenute a temperatura ambiente diminuiva drasticamente; lo stesso non accadeva per le uova tenute a 4°C. Infatti, il germe veniva evidenziato solo in 3 ripetizioni a 20-25°C, mentre a 4°C era reisolabile in tutte e 5 le ripetizioni da un numero elevato di uova (mediamente 4 uova per ripetizione). A 36 ore dall'infezione il microorganismo si poteva ancora evidenziare occasionalmente sia dai gusci delle uova conservate a temperatura ambiente che da quelli posti a temperatura di refrigerazione (n.2 gusci di una sola ripetizione a temperatura ambiente e n.1 guscio di due ripetizioni a 4°C). La ricerca del microorganismo sia dall'albume che dal tuorlo, se l'immersione nella soluzione inquinante perdurava per

un minuto, consentiva il reisolamento sporadico del germe indipendentemente dalla temperatura di conservazione. A temperatura ambiente il *C. jejuni* veniva reisolato da un singolo uovo e per una sola ripetizione sia dall'albume che dal tuorlo a 30' dall'inquinamento, da un solo tuorlo dopo 6 ore e da un singolo albume dopo 24 ore. A 4°C il *C. jejuni* veniva evidenziato da un singolo albume per una sola ripetizione a 30' dall'inquinamento, da un albume e da un tuorlo dopo 6 ore, e da un solo albume dopo 24 ore. In nessun caso il germe era reisolato dopo 36 ore dall'infezione delle uova. Se il tempo di immersione nella sospensione batterica veniva prolungato a 15 minuti il *C. jejuni* poteva essere isolato con frequenza maggiore sia dall'albume che dal tuorlo, specie se tenuto a temperatura di refrigerazione; questa consentiva il reisolamento da ben 3 tuorli su 5 dopo 3 e 12 ore di conservazione. Nell'albume e nel tuorlo inquinati sperimentalmente si osservava, dopo 48 ore, un calo significativo e profondo della carica batterica, che interessava in particolare l'albume (conservato sia a temperatura ambiente che 4°C) ma anche il tuorlo tenuto a temperatura ambiente (Figura 1). Nell'albume, dove il germe sopravviveva per un massimo di 9 giorni indipendentemente dalla temperatura di conservazione, la riduzione della carica infettante raggiungeva 5 log₁₀ UFC/ml. Nel tuorlo refrigerato, invece, la quantità di germi presenti si manteneva costante nelle prime 48 ore, e diminuiva progressivamente nei giorni successivi. Il Minimo Numero Probabile (MPN/ml) riscontrato variava infatti da 10¹⁰ a 10^{9,3} UFC/ml dopo 48 ore. Dopo 6 giorni diminuiva di soli 2,14 log₁₀ UFC/ml per poi calare progressivamente a meno di un log₁₀ UFC/ml (0,84 log₁₀ UFC/ml) al 25° giorno. Se il tuorlo veniva conservato a temperatura ambiente la carica batterica diminuiva in modo più incisivo già entro le 48 ore e si riduceva progressivamente nei giorni successivi, sopravvivendo fino alla 22^a giornata dall'infezione. Infatti, alla 48^a ora il MNP/ml calava di ben 3,96 log₁₀ UFC/ml, e si riduceva di 1,38 log₁₀ UFC/ml dopo 7 giorni.

Discussione

I risultati ottenuti evidenziano che la capacità di sopravvivenza del *Campylobacter jejuni* sulla superficie del guscio, è limitata a poche ore dall'infezione. La resistenza del germe, tuttavia, sembra essere influenzata dalla refrigerazione delle uova che influisce positivamente sulla vitalità del germe (6). Scarsa sembra invece la capacità di penetrazione del guscio e la successiva contaminazione del contenuto dell'uovo. Nelle nostre ricerche è stato infatti osservato che il germe attraversa occasionalmente il guscio e che l'inquinamento del contenuto dell'uovo è influenzato dalla carica infettante oltre che dal tempo di immersione nella sospensione batterica. Il *C. jejuni*, tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali, non è in grado di replicare, né nel tuorlo né nell'albume. Il potere inibente dell'albume, infatti, riduce in maniera significativa (di ben 5 log₁₀ nel volgere di 48 ore) il titolo (UFC/ml) del germe, che è ancora riscontrabile dopo 9 giorni dalla contaminazione sperimentale. Ricerche di altri AA, (5, 6) hanno evidenziato lo stesso calo ma anche la scomparsa del germe dall'albume entro 24-48 ore dall'infezione, utilizzando una carica

infettante pari a 3-6 log₁₀ UFC/ml. È verosimile che questa apparente discordanza nei risultati da noi ottenuti sia imputabile alla elevata carica infettante utilizzata durante le nostre ricerche (10¹⁰ UFC/ml). Ben maggiore appare invece la capacità di sopravvivenza del germe all'interno del tuorlo, dove il *Campylobacter jejuni* era ancora reisolabile dopo 25 giorni dall'infezione. Si sottolinea come evidenziato da Hanninen *et al.* (5), che la capacità di resistenza del germe all'interno del tuorlo potrebbe essere legata anche ad intrinseche caratteristiche del ceppo batterico utilizzato.

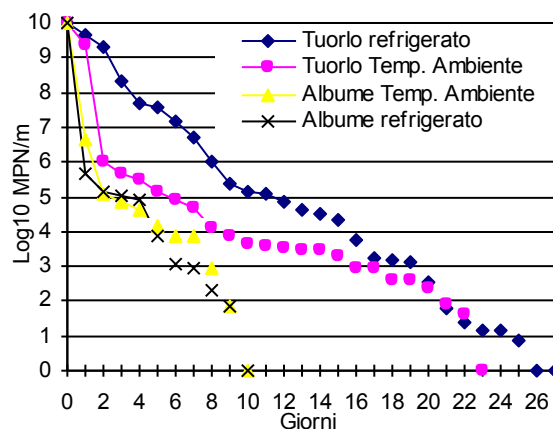
In conclusione, dalle nostre ricerche si evince che il germe può sopravvivere sul guscio, ma lo attraversa con difficoltà e solo occasionalmente ne infetta il contenuto anche se la carica inquinante è molto elevata. Non si può escludere, tuttavia, che le uova possano fungere da cross-contaminanti per frigoriferi ed alimenti in essi conservati e divenire un fomite, sia pure secondario, di tossinfezioni alimentari per l'uomo (4).

Bibliografia

1. Corry J.E.L., Atabay H.I. (2001) "Poultry as source of *Campylobacter jejuni* and related organisms" J. Appl. Microb. 90, 96-114
2. Di Modugno G., Nasti R., Camarda A., Circella E. (2000) "Tipizzazione ed antibiotico resistenza di *Campylobacter jejuni* isolati da contenuto intestinale, ovidutto e guscio di uova da consumo" Sel. Vet. 8-9, 741-750
3. Di Modugno G., Camarda A., Circella E., Ficarella V. (2000) "Aspetti epidemiologici delle infezioni da *Campylobacter jejuni* negli allevamenti di pollame" Sel. Vet. 11, 946-960.
4. Finch M.J., Blake P.A. (1985) "Foodborne outbreaks of campylobacteriosis: the United States experience, 1980-1982." Am. J. Epidemiol. 122, 262-268
5. Hanninen M.L., Korkeala H., Pakkala P. (1984) "Growth and survival characteristics of *Campylobacter jejuni* in liquid egg". J. Hyg. Camb., 92, 53-58
6. Maruyama S., Morita Y., Katsube Y. (1995) "Invasion and viability of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated Japanese quails' eggs" J. Vet. Med. Sci. 57 (3), 587-590

Figura 1: Sopravvivenza di *C. jejuni* in albume e tuorlo infettati sperimentalmente e tenuti a temperatura ambiente (20-25°C) ed a 4°C

Figure 1: Survival of *C. jejuni* in albumen and yolk experimentally contaminated and kept at 20-25°C and 4°C



COMUNICAZIONE 11

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA NEL BROILER DI DIVERSI PIANI VACCINALI CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE

M. Tamba, G. Tosi, P. Massi, F. Bacchiocchi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: Malattia di Newcastle, Pseudopeste Aviaria, protezione, vaccinazione

Efficacy of four vaccination schemes against Newcastle disease in broilers

Keywords: Newcastle disease, protection, vaccination

Summary: A serological survey has been carried out on broilers vaccinated against Newcastle disease. Only vaccination schemes including inactivated vaccines resulted able to induce protective umoral immunity. Therefore during epidemic the choice of these schemes seems right.

Correspondence: Marco Tamba, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna. Sezione di Bologna, Via Fiorini, 5. 40127 Bologna. Tel. +39-0514200032. Fax. +39-0514200038. E-mail: izsle@iperbole.bologna.it

Introduzione

In seguito alla recente epidemia di Malattia di Newcastle il Ministero della Sanità ha emanato un piano nazionale di vaccinazione con lo scopo di aumentare l'immunità della popolazione avicola italiana nei confronti di questa malattia. Il piano nazionale inizialmente prevedeva per i broiler almeno due interventi vaccinali: il primo all'incubatoio (1 giorno di vita) mediante l'utilizzo di un vaccino vivo attenuato, seguito da almeno un richiamo con vaccino inattivato. In seguito alla richiesta del mondo produttivo l'obbligatorietà dell'uso di un vaccino spento come richiamo è venuta meno, tuttavia è stata confermata l'obbligazione della vaccinazione e dei due interventi. La somministrazione di vaccino inattivato per via parenterale stimola una valida risposta umorale (2), necessaria alla completa protezione dall'infezione. L'immunità cellulo-mediata, infatti, non è sufficiente da sola a proteggere dal challenge con virus patogeno, che invece si ottiene in presenza di titolo anticorpale (1). Da tempo inoltre è noto che, in caso di infezione, all'aumentare del titolo anticorpale indotto dalla vaccinazione diminuisce la durata e la quantità di virus escreto dagli animali infetti (3). Scopo del presente lavoro è quello di confrontare l'efficacia dei piani vaccinali che prevedono l'impiego di un vaccino inattivato con quelli che prevedono esclusivamente l'uso di vaccini vivi attenuati.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati mediante il test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) 13.641 campioni di sangue prelevati da 692 gruppi di broiler macellati in stabilimenti dell'Emilia Romagna nel periodo 01/01/01-10/07/01 e provenienti sia dal territorio regionale (77,2%) che extraregionale (22,8%). Contestualmente al prelievo sono state raccolte informazioni sul piano vaccinale applicato e sull'età degli animali macellati.

Sulla base dello schema vaccinale impiegato nell'allevamento di origine i gruppi di broiler esaminati sono stati raggruppati in 4 protocolli:

Protocollo A) 2 vaccinazioni con vaccini vivi attenuati di cui la prima in incubatoio (1g di vita) e la seconda a circa 15 (min. 12 – max. 32) giorni di vita dell'animale;

Protocollo B) 3 vaccinazioni con vaccini vivi attenuati di cui la prima in incubatoio, la seconda a 14-15 giorni, seguita da un ulteriore richiamo a circa 28 (min. 20 – max. 35) giorni di vita;

Protocollo C) sotto questo protocollo sono stati riuniti due schemi che prevedono un richiamo per via parenterale con vaccino inattivato: il primo prevede 2 vaccinazioni con un vaccino vivo attenuato a 1 e 14 giorni di età, seguite da un richiamo con vaccino inattivato a 28 giorni di vita; il secondo una vaccinazione con vaccino vivo attenuato all'incubatoio, un richiamo con vaccino inattivato a 10-11 giorni di età, seguiti talvolta un ulteriore richiamo con vaccino vivo attenuato a 17-18 giorni di età;

Protocollo D) doppia vaccinazione con vaccino vivo attenuato e inattivato in incubatoio, seguita da un eventuale richiamo con vaccino vivo a 14 (min. 10 – max. 18) giorni di vita.

L'efficacia dei diversi protocolli vaccinali è stata valutata calcolando la prevalenza dei soggetti sieronegativi (animali sensibili) e quella dei soggetti con titolo alla HI uguale o superiore a 1:32 (soggetti con titolo protettore). I confronti tra le prevalenze di questi due diversi indicatori è stata effettuata mediante il test del chi-quadro.

Per confrontare i titoli sierologici con quelli riportati in bibliografia è stata inoltre calcolata la media dei logaritmi naturali di 3.720 sieri (1.240 per i protocolli A e B, 620 per i protocolli C e D). Eventuali differenze nella distribuzione dei titoli sono state evidenziate mediante il test U di Mann-Whitney.

Risultati

In tabella 1 sono riportati, suddivisi per protocollo vaccinale, i risultati degli esami sierologici. Il protocollo vaccinale C, che prevede l'utilizzo di un vaccino inattivato come richiamo, fornisce la più alta percentuale di soggetti con titoli "protettori" (85,1%) e di gran lunga la minore prevalenza di soggetti sieronegativi (2,7%). Date le vistose differenze con i risultati forniti dagli altri protocolli vaccinali è stato ritenuto inutile eseguire confronti statistici con questo protocollo.

Dal confronto tra i due protocolli vaccinali che prevedono l'utilizzo esclusivamente di vaccini vivi attenuati emerge una limitata, ma significativa maggior efficacia dello schema B che utilizza 3 vaccinazioni rispetto a quello A che prevede 2 interventi vaccinali. Il protocollo B, infatti, produce una più elevata percentuale di soggetti con titoli protettori ($\chi^2=18,8$; $P<0,0001$) ed una minor percentuale di animali sieronegativi rispetto al protocollo A. In particolare la differenza tra i due protocolli è risultata più elevata per

quanto riguarda quest'ultimo indicatore, la differenza a favore del protocollo B è risultata di circa 10 punti percentuali (27,5% contro 37,8%; $\chi^2=131,7$; $P<0,0001$).

E' stato quindi messo a confronto il piano vaccinale D che prevedeva l'utilizzo del vaccino inattivato all'incubatoio con il protocollo B: gli animali vaccinati secondo il primo schema hanno una probabilità circa tre volte superiore di possedere una protezione immunitaria sufficiente nei confronti dell'infezione rispetto ai polli ai quali è stato applicato il secondo schema (O.R. 2,8; $\chi^2=270,6$; $P<0,0001$). Anche osservando la percentuale di animali sieronegativi associata ai due protocolli emerge una maggiore efficacia del protocollo D: la probabilità di risultare sieronegativi per gli animali ai quali è stato applicato il protocollo vaccinale B è superiore (O.R. 2,8; $\chi^2=141,5$; $P<0,0001$) a quella conseguente all'applicazione del protocollo D al quale è associata una percentuale di sieronegativi del 11,9%.

Quanto sopra riportato è stato confermato dal calcolo dei principali parametri statistici dei titoli anticorpali stimolati dai quattro protocolli vaccinali (Tabella 2). Entrambi i protocolli vaccinali che utilizzano solamente vaccini vivi attenuati mostrano un titolo medio inferiore al titolo considerato protettivo; al contrario tutti i protocolli che prevedono l'impiego di vaccino inattivato somministrato per via parenterale hanno stimolato titoli anticorpali medi superiori alla soglia considerata protettiva (1:32). La distribuzione dei titoli all'interno di ciascun protocollo vaccinale ha mostrato differenze significative al test U di Mann-Whitney; in particolare degne di nota sono state le differenze rilevate tra i protocolli A e B ($Z=-3,8$; $P=0,0001$) e B e D ($Z=-8,5$; $P<0,0001$).

In realtà le differenze tra i protocolli A e B sembrano più di tipo statistico, dovute cioè al gran numero di campioni esaminati, che di tipo biologico. Se si osservano infatti gli andamenti dei due indici di efficacia individuati, percentuale di animali con titoli protettivi (Figura 1) e sieronegativi (Figura 2), si possono notare andamenti molto simili delle curve.

Tabella 1: Riepilogo dei titoli alla HI stimolati dai diversi protocolli vaccinali

Table 1: HI titres obtained using different vaccination schemes

Protocollo vaccinale	N° gruppi	N° campion	% negativi	% non protetti (1:4-1:16)	% protetti ($\geq 1:32$)
A	322	6.320	37,8	25,3	36,9
B	252	4.968	27,5	31,6	40,9
C	50	1.000	2,7	12,2	85,1
D	68	1.353	11,9	22,0	66,1
Totale	692	13.641			

Tabella 2: Media, mediana e moda dei titoli anticorpali stimolati da ciascun protocollo vaccinale

Table 2: Average, median and mode of antibody titres induced by each vaccination scheme

Protocollo vaccinale	N° gruppi	N° camp.	Media	Deviaz. Stand.	Mediana	Moda
A	62	1.228	1:12,4	$\pm 9,1$	1:16	Neg.
B	62	1.231	1:15,9	$\pm 7,2$	1:16	Neg.
C	31	620	1:97,9	$\pm 4,2$	1:128	1:128
D	31	620	1:43,5	$\pm 6,6$	1:45,3	1:32

Discussione

Dall'analisi dei dati si evince che tra i protocolli vaccinali esaminati solamente quelli che prevedono l'utilizzo di vaccini inattivati sono risultati in grado di stimolare una valida risposta umorale. In tempi di emergenza e post-emergenza, la scelta di obbligare l'utilizzo di vaccini inattivati appare quindi corretta, mentre appare rischiosa la scelta di vaccinare i broiler solamente con vaccini vivi a causa soprattutto dell'elevato numero di soggetti che restano senza adeguata protezione anticorpale.

Bibliografia

1. Reynolds D.L., Maraqa A.D., (2000). *Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity*. Avian dis., 44(1): 145-154.
2. Takada A., Kida H., (1996). *Protective response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus*. Vet. Microbiol., 50: 17-25.
3. Westbury H.A., Parsons G., Allan W.H., (1984). *Duration of excretion of virulent Newcastle disease virus following challenge of chickens with different titres of serum antibody to the virus*. Austr. Vet. Journal, 61(2): 44-46.

Figura 1: Broiler con titoli protettivi ($\geq 1:32$) alla macellazione

Figure 1: Broiler with protective titres ($\geq 1:32$) at slaughtering

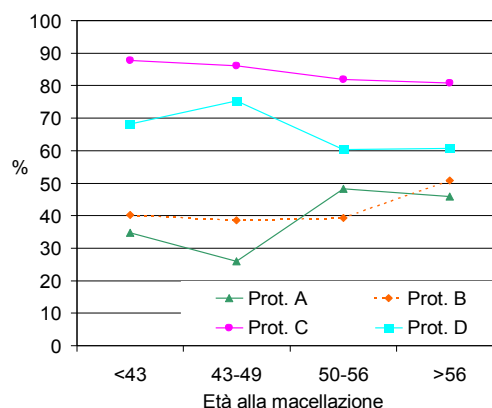
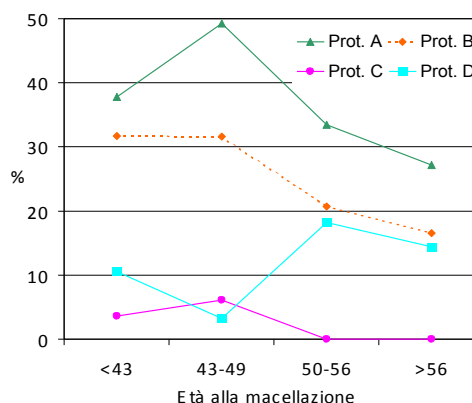


Figura 2: Broiler sieronegativi alla macellazione

Figure 2: Broiler tested seronegative at slaughtering



COMUNICAZIONE 12**ISOLAMENTO E TIPIZZAZIONE PRELIMINARE DI UNA POTENZIALE NUOVA VARIANTE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE****A. Moreno Martin¹, P. Cordioli¹, F. Paganelli², A. Treccani³, A. Zanella⁴, A. Lavazza¹**¹Reparto Virologia Specializzata - IZS Lombardia ed EmiliaBrescia; ²Sezione di Forlì - IZS Lombardia ed Emilia; ³Veterinario Libero Professionista, Brescia; ⁴Sezione di Microbiologia ed Immunologia, Facoltà Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: bronchite infettiva, coronavirus, ceppo virale, PCR, neutralizzazione, tipizzazione

Isolation and typing of a potential new variant of the avian infectious bronchitis virus

Key words: infectious bronchitis, coronavirus, viral strain, PCR, neutralisation, typing

Summary: A strain of IBV, called 216/01, recently isolated from broiler with respiratory disease was characterised by using RT-PCR and virusneutralisation test with reference sera 793-B, 624-I, Massachusetts M41, Connecticut, D274, Arkansas 99, Australia T, J.M.K., Grey and some antisera against the main variants described in Italy. Preliminary data indicates this strain as apparently different from the viral strains actually diffused in North Italy.

Corrispondente: Ana Moreno Martin, Reparto Virologia specializzata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna., Via Bainchi 9. 25124 Brescia. Tel. +39-030 2290331. Fax. +39-030 2425251. E-mail: amoreno@ibs.izs.it

Introduzione

Negli ultimi anni, la bronchite infettiva aviaria sta causando notevoli problemi sanitari ed economici nella industria avicola italiana, specialmente nel settore dei broilers, ma anche nelle ovaiole e nei riproduttori. Ciò è in parte dovuto alla notevole variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti che, malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 e talvolta con il ceppo 4/91 (793B), continuano a determinare la comparsa di forme cliniche causa di rilevanti perdite economiche. Anche il tropismo virale diviene sempre più variabile e si manifesta con differenti forme cliniche, dalle respiratorie o renali più frequenti nei broilers a quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione ed alterazione della qualità del guscio tipiche di ovaiole e riproduttori.

A partire dal 1956 (2), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di IBV nei vari continenti, isolati anche da polli vaccinati con il ceppo classico Massachusetts. A tutt'oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi e, tuttavia, si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. L'elevata variabilità del virus sarebbe riconducibile fondamentalmente alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli spikes, la cui sequenza aminoacidica, nei diversi sierotipi, può presentare variazioni, a volte anche solo di pochi aminoacidi (1).

Lo scopo del presente lavoro è quello di riferire in merito all'isolamento di un ceppo del virus della bronchite infettiva aviaria (BS 216/01) che, in base alla tipizzazione preliminare, potrebbe rappresentare una nuova variante.

Materiali e Metodi

Anamnesi. Allevamento di ovaiole leggere di 23 settimane di età che, nonostante diversi trattamenti vaccinali nei confronti della bronchite infettiva con vaccini attenuati H120 e 4/91 e inattivato contenente il ceppo M41 e le varianti olandesi, presentavano mancato raggiungimento del picco di ovodeposizione ed alterazioni della qualità del guscio.

Isolamento ed identificazione virale. Il virus è stato isolato da tamponi cloacali sospesi in MEM antibiotato

ed inoculati in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo di 9-11gg., incubate a 37°C e sperate quotidianamente. A partire dal 7°-8° giorno di incubazione gli embrioni erano esaminati per valutare la comparsa delle lesioni tipiche tra le quali in particolare: nanismo, arrotolamento ed arricciamento delle piume. Le lesioni sono state evidenziate dopo due passaggi ciechi. La diagnosi è stata quindi confermata dalla individuazione di particelle virali riferibili a coronavirus, in microscopia elettronica con colorazione negativa (microscopio TEM Philips CM10 operante a 80 Kv, a 28500 ingrandimenti).

Per la caratterizzazione si è fatto ricorso sia ad un test di virus-neutralizzazione sia alla tipizzazione sierologica che alla caratterizzazione molecolare in PCR.

Virus-Neutralizzazione (VN): È stato applicato il metodo α : virus variante (diluizioni \log_{10}), siero costante (diluizione 1:5). Le diverse diluizioni del virus vengono a contatto con gli antisieri specifici per 1h a temperatura ambiente ed in seguito ogni diluizione viene inoculata su 4 uova embrionate di pollo in cavità allantoidea. Dopo 7-8gg di incubazione a 37°C ed una speratura giornaliera, vengono osservati gli embrioni per valutare la presenza di lesioni specifiche. L'indice di neutralizzazione (IN) viene espresso come valore \log_{10} calcolato con il metodo Reed e Muench.

Sono stati testati diversi antisieri: 793-B (siero di referenza), 624-I (fornito da Dr. Capua I., IZS delle Venezie, Padova), Massachusetts M41, Connecticut, D274, Arkansas 99, Australia T, J.M.K., Gray (sieri di collezione). Inoltre sono stati utilizzati antisieri di produzione propria nei confronti di ceppi nefropatogeni isolati in Italia AZ 23/74, FA 6881/97 e PV 1731/65 (4). Il ceppo BS216/01 è stato testato anche con il siero omologo.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): Dal liquido allantoideo raccolto in seguito al terzo passaggio su UEP, è stata eseguita la PCR secondo la metodica dettagliatamente descritta (3). La prova è stata condotta in due fasi, dapprima con dei primers universali su tutti i ceppi per la sola individuazione del virus della bronchite infettiva e successivamente con l'utilizzo di diversi primers

specifici in grado di riconoscere alcuni dei principali ceppi di IBV: M41, 793B e D274.

Risultati e Discussione

Il dettaglio dei risultati ottenuti nelle singole prove è riportato in Tabella 1. Gli esiti della prova di VN appaiono particolarmente significativi, considerato che soltanto il siero omologo ha fornito un indice di neutralizzazione elevato, mentre in tutti gli altri casi il risultato è stato nettamente negativo, contrariamente a quanto si osserva solitamente con la maggior parte dei ceppi isolati, per i quali si osservano costantemente alcune reazioni crociate anche se con titoli variabili ma spesso <2.

Tabella 1: Risultati delle prove di tipizzazione del ceppo BS216/01

Table 1: Results of the tests adopted for typing the BS216/01 IBV strain

SIERI	VN	PCR
BS216/01	6	n.e.
M41	<1	NEG
793B	<1	NEG
624I	<1	n.e.
D274	<1	NEG
J.M.K.	<1	n.e.
Grey	<1	n.e.
Australia T	<1	n.e.
Con	<2	n.e.
Ark 99	<1	n.e.
FA6881	<1	n.e.
AZ23/74	<1	n.e.
PV1731/65	<1	n.e.

n.e. = non eseguito

La RT-PCR conferma, seppur soltanto parzialmente considerata l'attuale limitata disponibilità di primers, l'esito ottenuto con la prova di VN. Le tre varianti testate, tra le più diffuse negli allevamenti italiani, hanno infatti fornito esito negativo.

Affiancando i dati anamnestico-clinici dell'allevamento interessato, gli esiti analitici delle prove suddette e l'individuazione virale ottenuta in microscopia elettronica, appare possibile determinare con certezza la diagnosi di Bronchite Infettiva; l'esito della prova di VN e quelli preliminari della prova di RT-PCR inducono a pensare ad un ceppo poco diffuso o ad una variante potenzialmente nuova per la realtà italiana. Ciò anche in considerazione del fatto che tra i sieri testati sono compresi anche alcuni sieri omologhi ottenuti da ceppi (FA6881/97, AZ23/74, PV 1731/65) isolati in Italia (4).

Conclusioni

I risultati osservati consentono di ipotizzare l'isolamento di una potenziale nuova variante del virus IBV, per la quale si ritiene di conseguenza necessario approfondire l'osservazione tramite ulteriori indagini di caratterizzazione molecolare.

Il presente isolamento porta comunque l'attenzione ancora una volta al problema dell'elevata variabilità che questo agente patogeno presenta e che giustifica l'esigenza di una più approfondita sorveglianza epidemiologica ed anche ad una riconsiderazione sulla scelta dei ceppi (Classico M41 e di recente in Italia 793B) utilizzati per l'allestimento dei presidi vaccinali.

Bibliografia

1. Cavanagh, D. (1998). Discussion of issues raised during the 1998 International Symposium of Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry. Ranischholzhausen, June 15-18 1998, 373-380.
2. Jungherr, E.L.; Chromiak, T.W., Luginbuhl, R.E. (1956). Immunological differences in strains of Infectious bronchitis. Proc. 6th Ann. Meet. USLSA, 203-205.
3. Paganelli F., Tosi G., Masi P. (2001). Applicazione e confronto critico fra l'utilizzo delle uova embrionate di pollo e polymerase chain reactions, per l'identificazione del virus della Bronchite Aviare. Atti del 40° Convegno SIPA, in corso di stampa.
4. Zanella A., Coaro R., Marchi R., Fabris G., Lavazza A. (2000). Avian infectious bronchitis virus: isolation of an apparently new variant in Italy. Vet Rec 146, 191-193.

COMUNICAZIONE 13**ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLA LEUCOSI AVIARE****P. Massi, F. Paganelli G. Tosi***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

Parole chiave: virus della leucosi aviare, sottogruppo J, fibroblasti di embrione di pollo, antigene p27.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AVIAN LEUKOSIS VIRUS

Key words: avian leukosis virus, subgroup J, chicken embryo fibroblasts, antigen p27.

Summary: a method of detection of avian leukosis virus is described. A study on 15 outbreaks (including meat-type breeders, broilers, layers and cockerels) of neoplastic diseases was conducted. To obtain a differential diagnosis between avian leukosis and Marek's disease a correlation between gross pathology, microscopic lesions and virus isolation is discussed.

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

Introduzione

I virus della leucosi/sarcoma aviare (ALSV) sono retrovirus di tipo C responsabili di una serie di malattie neoplastiche benigne e maligne che colpiscono le specie avicole e, in particolare, il pollo (3). Tali virus presentano un antigene comune, gruppo-specifico, denominato p27 e rilevabile mediante l'impiego di tecniche diagnostiche quali l'ELISA e la fissazione del complemento. Esiste inoltre una glicoproteina dell'envelope virale, chiamata gp85, responsabile della suddivisione degli ALSV nei sottogruppi A, B, C, D, E e J. Al sottogruppo E appartengono i cosiddetti "virus endogeni" il cui DNA è integrato nel genoma delle cellule di quasi tutte le linee genetiche di pollo. Fino a qualche anno fa la forma patogena più comune, causata dai sottogruppi A, B, C, e D, era la leucosi linfocitica. Di più recente comparsa è la leucosi mieloide, sostenuta dal sottogruppo J e osservata inizialmente in alcune linee di riproduttori pesanti. Nell'ambito delle malattie neoplastiche si impone pertanto una corretta diagnosi differenziale tra le varie forme di leucosi aviare e la malattia di Marek. Non sempre, infatti, le lesioni macro e microscopiche consentono una diagnosi eziologica certa, considerando anche la possibile concomitanza di entrambe le forme virali. Scopo del presente lavoro è illustrare l'impiego di un importante strumento diagnostico basato sull'isolamento degli ALSV su colture di fibroblasti di embrione di pollo appartenenti ad una linea genetica indenne e resistente ai virus endogeni (1).

Materiali e Metodi

Preparazione delle colture cellulari: sono state allestite colture primarie di fibroblasti di embrione di pollo (CEF) a partire da uova "specific pathogen free" (SPF) appartenenti alla linea genetica 0 fenotipo C/E. Le uova sono state fornite dall'Institute of Animal Health di Compton (UK). Le colture sono state ottenute da embrioni prelevati dopo 10 giorni di incubazione. Dopo la fase di tripsinizzazione le cellule sono state diluite in terreno di crescita HAM'S F10 + M199 supplementato con siero fetale bovino (FCS) 10% (v/v) fino ad ottenere una concentrazione di $2,5 \times 10^5$ cellule/ml. La sospensione cellulare è stata seminata in flasks da 25 cm² che sono state incubate a 37°C, CO₂ 5%. Il monostrato ha raggiunto la completa confluenza in circa 24 ore.

Preparazione dei campioni: Gli organi, sede di lesioni macroscopiche, sono stati prelevati (soprattutto fegato e milza) e successivamente omogeneizzati con

tampone fosfato antibiotato e supplementato con 1% (v/v) di Tween 80.

Infezione delle CEF: trascorse 24 ore dalla preparazione delle CEF il terreno di crescita è stato eliminato e sostituito con un nuovo terreno supplementato con FCS 2% (v/v). Inoltre 400 µl di ogni campione in esame sono stati inoculati in doppio in altrettante flasks; invece 5 flasks sono state inoculate con tampone fosfato antibiotato e 0,1% (v/v) di Tween 80, che sono servite come controllo negativo. Le colture infettate non presentavano effetto citopatico. Trascorsi 9 giorni dall'infezione, sono stati aggiunti ad ogni flask 320 µl di 5% (v/v) di Tween 80, per poi congelare/scongelerare il campione per 3 volte. Il materiale così ottenuto è stato sottoposto ad un'ELISA indiretta (KPL®) per la ricerca dell'antigene p27.

Esami sierologici: in alcuni dei casi osservati gli accertamenti diagnostici sono stati completati dal prelievo di campioni di sangue sottoposti a metodiche ELISA indirizzate alla ricerca dell'antigene p27 (KPL®) e degli anticorpi prodotti nei confronti della gp85 (KPL®).

Risultati e Discussione

I risultati dell'indagine sono riassunti nella tabella 1. Nei due casi in cui è stato ottenuto l'isolamento virale esiste una perfetta corrispondenza tra tale riscontro diagnostico e l'osservazione di lesioni macro (figure 1 e 2) e microscopiche, ritenute indicative o addirittura patognomiche (come ad esempio le neoplasie ossee) nella leucosi mieloide (4). Questi risultati andranno ulteriormente approfonditi attraverso l'identificazione (mediante PCR) del sottogruppo di appartenenza dei ceppi isolati (5). Un altro dato interessante riguarda l'isolamento del virus in un gruppo di broilers a fine ciclo. Finora, infatti, la diagnosi di leucosi mieloide in questa tipologia produttiva si basava solo sul riscontro di lesioni istopatologiche presuntive di tale malattia (2). Infine, dall'indagine vengono confermati i dubbi interpretativi delle prove sierologiche attualmente a disposizione, in particolare per ciò che riguarda la ricerca dell'antigene p27 la cui presenza è da ritenersi ubiquitaria in tutte le linee genetiche allevate.

Bibliografia

1. Fadly A.M., Witter R.L. (1998) "Oncornaviruses: Leukosis/sarcoma and reticuloendotheliosis" in: American Association of Avian Pathologists: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th edition. Kennett Square, PA; 135-142.

- Massi P., Tosi G., Rampin T., Sironi G., Zanella A. (2000) "Liver lesions in broilers from ALV-J infected breeders". In: Kaleta E.F.: Proceedings of international symposium on ALV-J and other avian retroviruses; Rauscholzhausen, Germany, 5-8 June 2000. Institut für Geflügelkrankheiten Justus Liebig University, Giessen, Germany, 192-195.
- Payne L.N., Fadly A.M. (1997) "Leukosis/Sarcoma group" in: Calnek B.W.: Diseases of Poultry 10th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 414-510.
- Payne L.N., Venugopal K. (2000) "Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticulo-endotheliosis". Rev.sci.tech.Off.int.epiz., 19, 544-564.
- Smith L.M., Brown S.R., Howes K., McLeod S., Arshad S.S., Barron G.S., Venugopal K., McKay J.C., Payne L.N. (1998) "Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus". Virus Research, 54, 87-98.

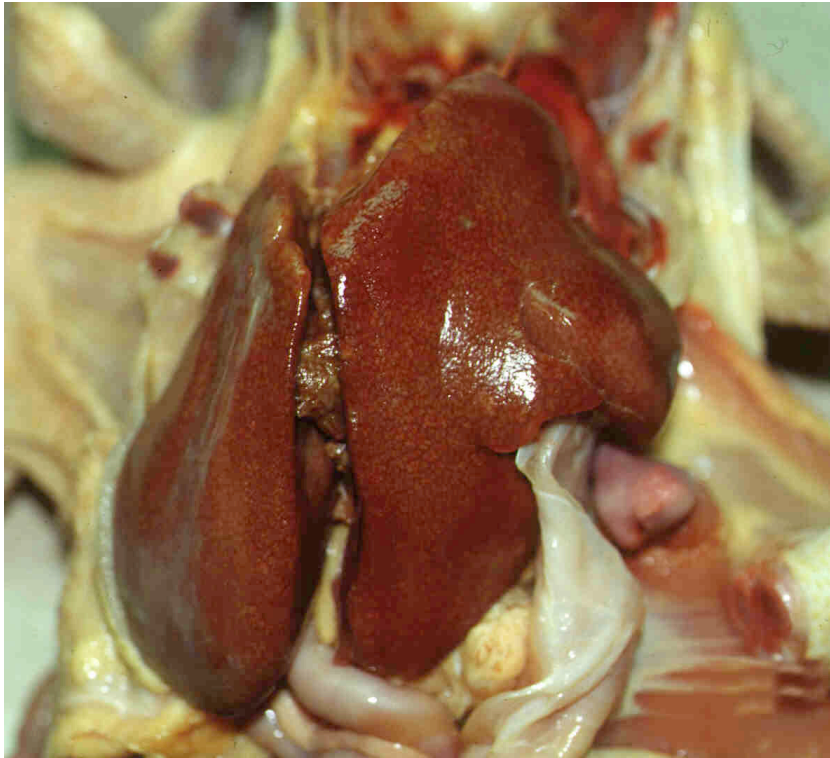
Tabella 1: Riepilogo dei risultati**Table 1:** Summary of the results obtained

Tipo di allevamento ed età	Lesioni macroscopiche	Lesioni microscopiche	Virologico CEF ed ELISA per Ag p27	ELISA su siero per Ag p27	ELISA su siero per Ab gp85
Galline Ovaiole 26w	Granulomi ossei	Granulomi batterici	NEGATIVO	50% POSITIVI	50% POSITIVI
Galline Ovaiole 26w	Neoplasia fegato cuore ovaio cute mesentero	Malattia di Marek	NEGATIVO	30% POSITIVI	50% POSITIVI
Broilers fine ciclo	Sclerosi epatica	Mielociti mieloblasti eterofili	NEGATIVO	N.E.*	N.E.
Riproduttori pesanti 40w	Neoplasia fegato milza, ovaio proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 25w	ovarite	Non reperti di rilievo	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 28w	Neoplasia fegato milza, ovaio proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 28w	Involuzione ovarica	Non reperti di rilievo	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Galline ovaiole	Neoplasia fegato milza	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 46w	Neoplasia fegato e mesentero	Linfociti eterofili mielociti	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Galletti 22w	Neoplasia fegato e proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	30% POSITIVI	10% POSITIVI
Galline ovaiole 26w	Neoplasia fegato e proventriglio	N.E.	NEGATIVO	50% POSITIVI	NEGATIVI
Broilers 43gg	Neoplasia proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Broilers fine ciclo	Epatosi	Fibrosi epatica	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 30w	Neoplasia ossea mesentero e pancreas	mielocitomatosi	POSITIVO	10% POSITIVI	5% POSITIVI
Broilers fine ciclo	epatomegalia	mielocitomatosi	POSITIVO	N.E.	N.E.

* N.E.= non eseguito

Figura 1: Mielocitomatociti nei riproduttori pesanti: a) neoplasie sternali, b) neoplasie costali

Figura 2: Mielocitomatoci nei broilers: lesioni epatiche



COMUNICAZIONE 14

INFEZIONE OCULARE DA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* IN VARIE TIPOLOGIE D'ALLEVAMENTO

G. Tosi, P. Massi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Parole chiave: *Mycoplasma gallisepticum*, lesioni oculari, galline ovaiole, pollastre, broilers, galletti, fagiani

Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* ocular infection in different attitude farms

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, ocular lesions, layers, layer pullets, broilers, cockerels, pheasants

Summary: Outbreaks of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection observed during this year are described. MG infection occurred in different attitude farms (layers, replacement pullets, broilers, cockerels, pheasants). All cases were characterized by ocular localization of MG.

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

Introduzione

Mycoplasma gallisepticum (MG) è l'agente eziologico della "malattia cronica respiratoria" del pollo e della sinusite infettiva del tacchino, malattie responsabili di significative perdite economiche nei soggetti da carne, nei riproduttori e nelle galline ovaiole. Nel broiler MG può causare indici di mortalità del 5-10%, peggioramento degli indici di conversione ed elevati scarti (fino al 10-20%) alla macellazione. Nei riproduttori e nelle ovaiole si possono verificare cali di deposizione del 10-20%, spesso associati ad alterazione della qualità del guscio e, nei riproduttori, a indici di mortalità embrionale del 5-10%. Nella sua forma più classica la malattia sostenuta da MG è caratterizzata da tosse, rantoli, scolo nasale, sinusite, tracheite e dalla comparsa di gravi lesioni ai sacchi aerei (4). Sono rare le descrizioni di episodi di infezione da MG a livello oculare (2,3). Durante la primavera del 2001 sono stati isolati, in varie regioni italiane, ceppi di MG localizzati esclusivamente o prevalentemente nella congiuntiva dei soggetti colpiti. Scopo del presente lavoro è descrivere gli aspetti clinico-epidemiologici di questi casi e le metodiche diagnostiche utilizzate.

Materiali e metodi

Dati di campo: dei casi in esame venivano raccolti dati anamnestici, segni clinici, indici di morbilità e mortalità, interventi terapeutici adottati. Venivano eseguiti esami necroscopici su soggetti conferiti al laboratorio.

Esami di laboratorio: l'isolamento di MG veniva eseguito a partire dall'essudato presente nelle congiuntive e da altri tessuti sede di lesioni sospette (trachea, seni nasali, fessura palatina, sacchi aerei). Per l'isolamento veniva impiegato un terreno agar Frey. Le piastre venivano incubate a 37°C in atmosfera arricchita con 10% di CO₂ e osservate quotidianamente allo stereomicroscopico. Dalle colonie sviluppatesi veniva allestita una coltura pura mediante passaggi su terreno solido. La tipizzazione dei ceppi isolati veniva eseguita attraverso la metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) e mediante l'allestimento delle seguenti prove biochimiche: fermentazione del glucosio, idrolisi dell'arginina, riduzione del tetrazolio (sia in aerobiosi che in anaerobiosi) e produzione di "film and spot". Veniva inoltre valutata l'attività emoagglutinante nei confronti di globuli rossi di pollo (1).

In alcuni casi venivano eseguiti anche esami virologici su uova embrionale di pollo "specific pathogen free" (SPF) ed esami batteriologici per l'isolamento di eventuali forme batteriche d'irruzione secondaria. Venivano inoltre allestite prove sierologiche nei confronti di MG e di *Mycoplasma synoviae* mediante l'utilizzo dei seguenti tests: sieroaagglutinazione rapida (SAR), ELISA (KPL®) e inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

Risultati

Sulla base delle differenti tipologie d'allevamento i casi osservati possono essere schematizzati nel modo seguente:

Galline ovaiole: MG veniva isolato dalle congiuntive di galline ovaiole di 50 settimane di età allevate in gabbia e facenti parte di un allevamento multi-età. I soggetti colpiti presentavano intensa lacrimazione mono o bilaterale associata, in alcuni casi, a cheratite e a tracheite catarrale. L'indice di morbilità non superava lo 0.3-0.5%. La malattia colpiva "a spot" in tutto il capannone. Il gruppo veniva sottoposto a terapia con tylosina (50gr/100 litri di acqua da bere per 5 giorni) e la sintomatologia oculare regrediva nell'arco di due settimane. In seguito, nel gruppo colpito la mortalità aumentava per la comparsa di colissetticemia. La forma oculare si diffondeva andando ad interessare, nell'arco di 4 mesi, i gruppi vicini. In ogni capannone colpito le lesioni oculari erano sempre accompagnate da sintomi respiratori e da gravi tracheiti. Gli esami virologici e sierologici non consentivano tuttavia di dimostrare un'eventuale associazione tra MG e infezioni virali.

Pollastre: un gruppo di pollastre di 40 giorni di età presentava lacrimazione con edema congiuntivale, scolo nasale e aerosacculite. MG veniva isolato in purezza e solo a livello oculare. L'infezione si diffondeva ai due capannoni vicini e coetanei in cui decorreva in forma sub-clinica e veniva svelata dalla positività sierologica osservata circa 45 giorni più tardi. Al momento dell'isolamento di MG il gruppo colpito dalla forma clinica presentava già una positività sierologica alla SAR e, parzialmente, all'ELISA. Gli esami virologici escludevano l'intervento di forme virali. Le terapie adottate (ossitetraciclina+tylosina e, in seguito, enrofloxacin) non consentivano una rapida remissione dei segni clinici, i quali proseguivano per circa un mese (complicati anche da un'infezione setticemica sostenuta da E.coli).

In un altro allevamento di pollastre la malattia (caratterizzata da lacrimazione, sinusite e tracheite catarrale) compariva a 90 giorni di età. MG veniva isolato solo dalle congiuntive e i soggetti esaminati erano sierologicamente positivi alla SAR.

Infine, un gruppo di pollastre manifestava, a 60 giorni di età, un arrossamento della mucosa congiuntivale associato ad lacrimazione. La forma oculare sembra essere stata una prosecuzione della reazione conseguente alla vaccinazione (eseguita a 38 giorni di età) nei confronti della laringotracheite infettiva. La sintomatologia perdurava per circa 30 giorni. In questo caso MG non veniva isolato, ma l'infezione era diagnosticata sierologicamente. Da un controllo condotto a 90 giorni di età il gruppo presentava infatti una positività al test ELISA nei confronti di MG.

Broilers: una sindrome respiratoria localizzata alle prime vie aeree e associata a intensa lacrimazione era osservata in un gruppo di broilers di 32 giorni di età. MG veniva isolato solo dalle congiuntive e il gruppo presentava già una sensibile positività sierologica (fino a diluizioni di 1/160) alla HI. Gli esami virologici davano esito negativo.

Una forma congiuntivale associata a tracheite e aerosacculite fibrinosa veniva inoltre osservata in broilers di 46 giorni di età. MG veniva isolato da congiuntive e trachee.

Galletti: in un allevamento multi-età l'infezione oculare iniziava nel capannone ospitante i soggetti più giovani (50 giorni di età) e, in seguito, si diffondeva ai gruppi vicini (90 e 150 giorni di età). Inizialmente la malattia era caratterizzata da edema congiuntivale prevalentemente monolaterale. In seguito comparivano segni clinici e lesioni a carico dell'apparato respiratorio (tracheiti e aerosacculiti fibrinose). In questo caso la colonizzazione della mucosa congiuntivale da parte di MG era messa in relazione ad un'intensa reazione conseguente alla vaccinazione nei confronti della laringotracheite infettiva e a disfunzioni dell'impianto di ventilazione nel capannone dei soggetti più giovani.

Fagiani: una sindrome congiuntivale associata a sintomi e lesioni a carico dell'apparato respiratorio veniva osservata in due allevamenti di fagiani, rispettivamente a 35 e a 40 giorni di età. In entrambi i casi veniva isolato dalle congiuntive un ceppo di *Mycoplasma* successivamente sottoposto a prove biochimiche e ad immunofluorescenza indiretta. I risultati delle prove di tipizzazione non corrispondevano a quelli delle principali specie di micoplasmi aviari.

Caratteristiche dei ceppi isolati: MG sviluppava sui terreni colturali dopo 48-72 ore di incubazione. In due casi (galline ovaiole e pollastre di 90 giorni di età) le colonie di MG comparivano solo dopo 6 giorni di

incubazione. Tutti i ceppi isolati presentavano le medesime caratteristiche biochimiche (destrosio +, arginina -, tetrazolio + sia in aerobiosi che in anaerobiosi, "film and spot" -), presentavano attività emoagglutinante e reagivano positivamente alla prova di immunofluorescenza indiretta (IFI) nei confronti di MG. I ceppi isolati da fagiano sviluppavano in 48 ore, presentavano una debole reazione positiva alla IFI nei confronti di MG, mentre erano completamente negativi se cimentati con gli antisieri di altri micoplasmi aviari (*M.gallisepticum*, *M.synoviae*, *M.gallinarum*, *M.gallinaceum*, *M.gallopavonis* e *M.pullorum*); inoltre tutte le prove biochimiche eseguite fornivano esito negativo.

Discussione

I casi osservati presentano alcune caratteristiche comuni: localizzazione oculare di MG, comparsa di lacrimazione e congiuntivite, bassi indici di morbilità, lenta diffusione nel gruppo colpito e in quelli vicini, remissione dei sintomi dopo terapia antibiotica. Nel complesso i danni causati da questi ceppi "oculari" di MG si possono considerare limitati. Resta tuttavia interessante la segnalazione, nel medesimo periodo e in differenti tipologie di allevamento, di casi di micoplasmosi in cui MG sembra avere un certo tropismo per la mucosa congiuntivale. Restano da chiarire eventuali fattori condizionanti di natura infettiva e manageriale (rilevati solo nel caso diagnosticato nei galletti e in un gruppo di pollastre). I ceppi di MG isolati a livello oculare presentano caratteristiche culturali e biochimiche tipiche dei ceppi "classici". Sarebbe interessante approfondirne lo studio mediante la valutazione delle loro proprietà antigeniche e genomiche. Un cenno particolare meritano i ceppi isolati da fagiano. Il quadro clinico e anatomo-patologico osservato in questa specie è sovrapponibile a quello riscontrato nel pollo. Le caratteristiche biochimiche e il test di IFI non consentono tuttavia una precisa caratterizzazione dell'agente eziologico.

Bibliografia

1. Kleven S.H., Yoder H.W. (1989) "Mycoplasmosis" in: American Association of Avian pathologists.: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th edition. Kendall/Hunt publishing company, 57-62.
2. Nunoya T., Yagihashi T., Tajima M., Nagasawa Y. (1995) "Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens". *Vet.Pathology*, 32, 11-18.
3. Soeripto K.G., Whithear G.S., Harrigan K.E. (1989) "Virulence and transmissibility of *Mycoplasma gallisepticum*". *Aust.Vet.J.*, 66, 65-72.
4. Stipkovitis L., Kempf I. (1996) "Mycoplasmosis in Poultry". *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.*, 15, 1495-1525.

COMUNICAZIONE 15

UTILIZZO DI UN VACCINO ETEROLOGO NEI CONFRONTI DELL'INFLUENZA AVIARIA COME VACCINO "MARKER": PROVA DI CROSS-PROTEZIONE E VALIDAZIONE PRELIMINARE DEL TEST DISCRIMINATORIO

G. Cattoli¹, C. Terregino¹, V. Brasola¹, J.F. Rodriguez², A. Zuin¹, I. Capua¹

¹Laboratorio Virologia Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy ²Centro Nacional de Biotecnologia, Cantonblanco, Madrid, Spagna

Parole chiave: cross-protezione, influenza aviaria, vaccino marker

Cross-protection studies against HPAI of the H7N1 subtype using a heterologous H7N3 strain as a marker vaccine and development and preliminary validation of a serological discriminatory test

Key words: cross-protection, avian influenza, marker vaccine

Summary: The present paper reports the results of the laboratory investigations performed to evaluate the use of an inactivated vaccine containing a heterologous strain, possessing a different neuraminidase as a "marker vaccine" for the control of avian influenza. The clinical results of the challenge experiment performed using the inactivated vaccine containing the A/Ck/Pakistan/95/H7N3 strain of avian influenza against the Italian A/ty/Italy/4580/V99 HPAI virus, and the development and preliminary validation of a discriminatory test using a recombinant N1 protein are reported. The heterologous vaccine was able to induce a clinical protection of 93% regardless of the vaccination scheme used. Indirect immunofluorescence was used as the discriminatory test, and the preliminary results indicate that it was able to detect all infected (N1) positive groups. No false positives were recorded in sera negative to avian influenza, but 11% of false positive sera were recorded among the H7N3 vaccinated birds.

Correspondence: Ilaria Capua, Laboratorio Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Romea 14/A 35020, Legnaro, PD; email icapua@izsvenezie.it

Introduzione

L'Influenza aviaria (IA) è una malattia altamente contagiosa dei volatili sostenuta da *Orthomyxovirus* di tipo A. Questa malattia è in grado di causare ingenti danni economici (diretti ed indiretti) all'allevamento avicolo intensivo e per questo è stata inclusa nella Lista A dell'Office International des Epizooties, (OIE) che comprende le malattie altamente diffusive degli animali.

Come per altre malattie infettive presenti nella lista A dell'OIE, la vaccinazione è vietata nei paesi dell'Unione Europea (UE) (2), onde evitare l'interferenza con i piani di siero-sorveglianza ed eradicazione. La possibilità quindi di poter disporre di vaccini marker che rendano agevole la distinzione tra animali vaccinati ed animali infetti risulterebbe di notevole utilità. Le moderne tecniche di ingegneria genetica hanno portato allo sviluppo di vaccini vivi ingegnerizzati, i quali hanno inevitabilmente incontrato grossi ostacoli in fase di registrazione.

Nel corso del 1999/2000 l'Italia settentrionale è stata colpita da una grave epidemia influenzale causata dal sierotipo H7N1 che ha portato alla morte o al depopolamento di circa 14 milioni di volatili allevati intensivamente, principalmente tacchini e polli (1). Come *ultima ratio* nel controllo dell'epidemia si è dovuto ricorrere ad una profilassi vaccinale e, alla luce delle considerazioni sopra esposte, si è fatto ricorso all'utilizzo di un vaccino convenzionale inattivato di facile produzione, contenente un ceppo influenzale eterologo H7N3. Tale scelta è derivata dalla consapevolezza che la proteina dell'emoagglutinina è responsabile della produzione di anticorpi neutralizzanti (3), e che quindi qualunque virus H7 è in grado di stimolare la sintesi di anticorpi protettivi. La neuraminidasi (N) eterologa, avrebbe pertanto le potenzialità di essere sfruttata come *marker* naturale.

Nel presente lavoro si riportano i risultati clinici delle prove di cross-protezione *in vivo* fra il virus HPAI H7N1 ed il vaccino eterologo H7N3, e la messa a punto di un test sierologico discriminatorio, in grado di distinguere fra i soggetti infetti ed i soggetti vaccinati.

Materiali e metodi

Prova di cross protezione *in vivo*: La protezione indotta dal vaccino eterologo inattivato H7N3 è stata valutata in polli SPF sottoposti a due schemi vaccinali diversi mediante *challenge* con il virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99 come riportato di seguito. La prova è stata effettuata in isolatore, i soggetti sono stati alimentati con acqua e mangime *ad libitum*.

Gruppi sperimentali: Gruppo 1: 13 polli SPF vaccinati per via intramuscolare con dose singola di vaccino a 3 settimane età. Gruppo 2: 13 polli SPF vaccinati per via intramuscolare con singola dose a 2 ed a 4 settimane di età. Gruppo 3: 10 polli SPF, controllo non vaccinato, sottoposto a *challenge*, Gruppo 4: 10 polli SPF non vaccinati e non sottoposti a *challenge*.

Tutti i soggetti sono stati salassati a sei settimane di età per la valutazione del titolo sierologico mediante prova di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (2). Successivamente sono stati sottoposti a *challenge* mediante istillazione oculo-congiuntivale di 10^{7,5} EID₅₀ del virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99, ed osservati giornalmente allo scopo di rilevare la presenza di sintomatologia clinica riferibile ad influenza aviaria ad alta patogenicità, per un periodo di 2 settimane.

Messa a punto del test discriminatorio basato sulla ricerca degli anticorpi anti-N1. Il test si è basato sulla espressione della proteina N1 in un sistema di espressione baculovirus e del suo utilizzo come antigene. In breve, il gene codificante la proteina N1 del ceppo responsabile dell'epidemia è stato amplificato mediante RT-PCR, e clonato in vettori di espressione baculovirus (Bac-to-Bac System, Invitrogen Life Technologies). Cellule di insetto

Tricoplosia ni (High Five Cells, Invitrogen Life Technologies) sono state infettate con il baculovirus ricombinante ed utilizzate come antigene per la messa a punto di un test di immunofluorescenza indiretta (IFI) su micropiastra a 96 pozzetti. Sono stati complessivamente saggiati 38 gruppi di tacchini di cui 14 sierologicamente negativi all'antigene H7, 12 sierologicamente positivi H7N1 (infetti) e 24 sierologicamente positivi H7N3 (vaccinati) per un totale di 587 sieri di campo.

Risultati

Prova di cross-protezione *in vivo*: I risultati della prova di cross *protezione in vivo* sono riportati nella Tabella 1. Dei 13 soggetti vaccinati con unica somministrazione (Gruppo 1), un solo soggetto è venuto a morte, con sintomi e lesioni caratteristiche dell'influenza aviaria ad alta patogenicità. Questo soggetto presentava un titolo sierologico inibente l'emoagglutinazione *pre-challenge* di 1:4. In maniera analoga, dei 13 soggetti vaccinati 2 volte (Gruppo 2), un soggetto è venuto a morte in terza giornata con lesioni riferibili ad influenza aviaria ad alta patogenicità. Questo soggetto non presentava alcun titolo sierologico *pre-challenge* alla prova di inibizione dell'emoagglutinazione. Tutti i soggetti non vaccinati e sottoposti a challenge sono venuti a morte nell'arco di 4 giorni.

Messa a punto del test discriminatorio basato sulla ricerca degli anticorpi anti-N1.

I risultati della validazione preliminare del test di immunofluorescenza indiretta indicano che il test è stato in grado di individuare il 100% dei gruppi infetti. Nell'ambito dei sieri sierologicamente negativi all'antigene H7, non si sono verificate delle false positività, mentre nell'ambito dei sieri ottenuti dai soggetti vaccinati il test ha evidenziato l'11% di falsi positivi.

Discussione

Tabella 1: Risultati clinici della prova di *challenge* nei confronti del virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99 effettuata su soggetti vaccinati e non, con il vaccino eterologo A/ck/Pakistan/95/H7N3

Table 1: Clinical results of the challenge trial against the virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99 performed in non vaccinated and vaccinated birds with the heterologous vaccine A/ck/Pakistan/95/H7N3

	Gruppo 1 (1 intervento vaccinale)	Gruppo 2 (2 interventi vaccinali)	Gruppo 3 (non vaccinato sottoposto a challenge)	Gruppo 4 (controllo)
Numero animali	13	13	10	10
Totale morti nel periodo di osservazione	1	1	10	0
Indice di protezione	93%	93%	0	-

Da quanto sopra esposto, risulta che tutti e due gli schemi vaccinali utilizzati, basati sull'utilizzo di un vaccino eterologo inattivato contenente il ceppo A/Ck/Pakistan/95/H7N3, hanno determinato un indice di protezione del 93% nei confronti del challenge con virus HPAI A/ty/Italy/4580/V99. La mortalità osservata in un soggetto del Gruppo 1 ed in un soggetto del Gruppo 2 è verosimilmente da correlare al titolo sierologico non protettivo che presentavano i soggetti venuti a morte.

I risultati della validazione preliminare della prova per la ricerca degli anticorpi anti-N1 indicano un'ottima capacità di svelare la presenza di gruppi infetti. Rimane da determinare se i falsi positivi (evidenziati nell'ambito dei soggetti vaccinati) sono da ricondurre a cross-reazioni N1-N3 oppure ad altre cause, come ad esempio la circolazione di altri ceppi di virus influenzali N1.

I risultati della sperimentazione indicano che l'utilizzo di un vaccino inattivato, con emoagglutinina dello stesso gruppo e neuraminidasi eterologa è una strategia percorribile per il controllo dell'influenza aviaria, ottenendo da un lato una buona protezione clinica e nel contempo la possibilità di differenziare i soggetti vaccinati dai soggetti infetti.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare Serafino (Berto) Pianta per l'effettuazione delle prove di challenge in isolatore.

Bibliografia

- 1) Capua I., Marangon S. (2000). The avian influenza epidemic in Italy (1999-2000): a review. Avian Pathol 29, 289-294
- 2) CEC. (1992) Council Directive 92/40/EEC of 19 May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. O. J. of the European Commission L167, 1-15.
- 3) Suarez DL., Schultz Cherry S. (2000). Immunology of avian influenza virus: a review. Develop Comp Immunol 24, 269-283

COMUNICAZIONE 16

PROVA DI CROSS-PROTEZIONE NEI CONFRONTI DELLA VARIANTE BRONCHITE INFETTIVA 624/I UTILIZZANDO VACCINI COMMERCIALI CONTENENTI LE VARIANTI M41 E 793/B

C. Terregino, V. Brasola, B. Tramontan, D. Buson, F. Montesi, I. Capua
 Laboratorio Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy

Parole chiave: cross-protezione, bronchite infettiva, variante 624/I

Cross-protection studies against the Italian infectious bronchitis variant 624/I using commercially available vaccines containing the M41 and 793/B serotypes

Key words: cross-protection, infectious bronchitis, variant 624/I, commercial vaccines

Summary. A cross-protection study for the Italian infectious bronchitis variant 624/I was performed in SPF birds administered with commercial live vaccines containing the 793/B and M41 serotypes of infectious bronchitis. The degree of protection induced by different vaccination schemes was assessed by evaluating the degree of ciliostasis induced by the challenge virus on the tracheal epithelium and by scanning electron microscopy. A good degree of local protection was obtained in tracheal organ cultures with the H120-793/B scheme, while a lower degree of protection was achieved with the H120-Ma5 scheme. These results were confirmed by scanning electron microscopy. Further investigations are in progress to establish whether protection at the tracheal level is sufficient to prevent viraemia and colonization of target organs.

Corresponding author: Ilaria Capua, Laboratorio Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Romea 14/A 35020, Legnaro, (PD) Italy; email icapua@izsvenezie.it

Introduzione

Il virus della bronchite infettiva (IB) è un *Coronavirus*, prototipo della famiglia *Coronaviridae*. È un virus pleomorfo, di 90-200 nm di diametro, con genoma RNA a singolo filamento.

Utilizzando il test di virus-neutralizzazione sono stati identificati numerosi sierotipi, diversi sotto il profilo antigenico, ma tutti con alcune componenti antigeniche comuni. Tra i sierotipi "storici" sono da ricordare il Massachusetts ed il Connecticut, i quali prediligono il tratto respiratorio, mentre i sierotipi T, Gray e Holte sono prevalentemente nefrotropici.

Negli ultimi anni sono state isolate e caratterizzate diverse nuove varianti in Europa (1,7,8,10), mentre altre sembrano persistere ormai da diverso tempo (4) ed altre ancora sembrano riemergere dopo diversi anni (6).

In Italia la malattia è presente sia negli allevamenti di broiler (con forme morbose respiratorie e renali) che negli allevamenti di ovaiole e di riproduttori pesanti. Nel nostro paese circolano ceppi diversi tra cui l'M41, il 793/B (CR88 o UK 4-91), il ceppo nefropatogeno belga B1648 e le varianti italiane FA 6881 e 624/I (2,10). Quest'ultimo sierotipo è stato isolato da focolai diagnosticati in varie regioni italiane negli ultimi anni. Vaccini efficaci contro la bronchite sono disponibili in commercio già dagli anni '50. Nonostante il loro largo impiego, la bronchite infettiva rimane ancora uno dei principali problemi per l'allevamento avicolo a motivo principalmente della variabilità antigenica dell'agente eziologico.

In particolare la proteina S è risultata estremamente variabile, specie la subunità S1. Numerosi sierotipi noti differiscono tra di loro anche per più del 20% degli aminoacidi di questa proteina (9). Altri nuovi sierotipi possono invece essere il risultato del cambiamento di pochissimi aminoacidi della subunità S1 (3) mentre altri epitopi rimangono invariati. Poiché diversi antigeni sono in comune tra i numerosi ceppi conosciuti è probabile che uno stesso vaccino possa risultare protettivo verso differenti sierotipi. È stato infatti dimostrato (5) che la duplice vaccinazione con vaccino

IB vivo M41 al primo giorno di vita e 793/B a due settimane di età induce una buona protezione nei confronti di alcuni dei principali sierotipi IBV che attualmente causano problemi di bronchite infettiva (5).

Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare se l'immunità indotta da programmi vaccinali contenenti le varianti M41 e 793/B sono in grado di proteggere il pollo verso una infezione sperimentale con la variante 624/I.

Materiali e metodi

Animali utilizzati per la prova. Pulcini white leghorn SPF schiusi in isolatore. Gli animali sono stati alimentati con mangime e acqua *ad libitum*.

Virus di challenge. IB virulento, ceppo 624/I isolato da un focolaio di bronchite infettiva.

Vaccini. *Nobilis IB H120*, vaccino vivo liofilizzato contro la Bronchite infettiva ceppo M41 $\geq 10^{4.5}$ EID₅₀/dose. *Nobilis IB Ma5*, vaccino vivo liofilizzato contro la Bronchite infettiva ceppo M41 $\geq 10^3$ EID₅₀/dose. *Nobilis IB 4-91*, vaccino vivo liofilizzato contro la bronchite infettiva ceppo 4-91 (793/B) $\geq 10^{3.6}$ EID₅₀/dose.

Protocollo di challenge. 40 pulcini SPF sono stati inanellati, suddivisi in 4 gruppi ed accasati in 4 isolatori differenti in ragione di 10 pulcini per isolatore:

Gruppo 1V: pulcini vaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB H120* al primo giorno di vita e rivaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB 4-91* a 14 gg. di vita;

Gruppo 2CV: pulcini vaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB H120* al primo giorno di vita e rivaccinati per via oculo-nasale con *Nobilis IB Ma5* a 18 gg. di vita;

Gruppo 3CNVCh: pulcini di controllo non vaccinati, sottoposti a *challenge*;

Gruppo 4CNV: pulcini di controllo non vaccinati e non sottoposti a *challenge*.

All'età di 5 settimane i soggetti appartenenti ai tre gruppi 1V, 2CV e 3CNVCh sono stati infettati sperimentalmente con 100 μ l di una sospensione virale del virus di *challenge* ceppo 624/I, alla dose di log₁₀ 3.0 MCD (Dose Ciliostatica 50) somministrato per via oculo-nasale. Tutti i soggetti dei tre gruppi

sono stati tenuti sotto controllo per la durata dell'esperimento per evidenziare eventuali sintomi clinici riferibili a bronchite infettiva.

Quattro soggetti per gruppo sono stati sacrificati mediante somministrazione intravenosa di ketamina il quarto e settimo giorno dopo il *challenge*.

Valutazione della protezione *in vivo*. La valutazione dell'indice di protezione è stata effettuata valutando il grado di ciliostasi presente nelle trachee dei soggetti provenienti dai vari gruppi (5). In breve, da ogni trachea sono stati ottenuti e messi in coltura 10 anelli tracheali. A ciascun anello è stato dato un punteggio da 0 a 4 secondo la seguente scala:

0: motilità ciliare del 100%; 1: motilità ciliare del 75 %; 2: motilità ciliare del 50 %; 3: motilità ciliare del 25 %; 4: motilità ciliare assente (100% di ciliostasi).

L'indice di protezione per ciascun gruppo è stato calcolato dalla seguente formula: $(1 - \text{media del punteggio di ciliostasi del gruppo vaccinato ed infettato} / \text{media del punteggio di ciliostasi del gruppo di controllo infettato}) \times 100$. Inoltre, il danno ciliare causato dal virus di *challenge* e le differenze tra i gruppi sperimentali sono state valutate mediante esame al microscopio elettronico a scansione. Campioni di trachea di circa un centimetro e mezzo di lunghezza sono stati prelevati da ciascun soggetto a livello del terzo prossimale dell'organo, sezionati medialmente ed immediatamente fissati in glutaraldeide al 25% ed in tampone cacodilato per 2-4 ore. Successivamente, i frammenti sono stati lavati in tampone cacodilato, disidratati in alcoli ascendenti, e successivamente disidratati sotto pressione (critical point drying). I preparati sono stati quindi ricoperti con un film di carbone e preparati per la lettura al SEM (Cambridge) a 20Kv.

Risultati

Dalla prova di cross-protezione in vivo è emersa una buona protezione locale a livello dell'epitelio tracheale negli animali vaccinati ad un giorno con Nobilis IB H120 e a 14 giorni con il vaccino Nobilis IB 4-91 (contenente il sierotipo 793/B). In questo gruppo l'indice di protezione è stato del 91%. Un grado di protezione minore (45%) è stato ottenuto nei soggetti vaccinati con Nobilis IB H120 e richiamati con Nobilis IB Ma5 (Tabella 1).

L'esame della mucosa tracheale al microscopio elettronico a scansione ha confermato i risultati ottenuti dall'osservazione a fresco degli anelli tracheali. Le immagini relative alla trachea degli animali vaccinati con lo schema vaccinale H120-793/B hanno mostrato infatti una sostanziale integrità dell'epitelio respiratorio, nonostante qualche segno di reazione infiammatoria e di riduzione della clearance ciliare. Marcata è stata comunque la differenza rispetto al gruppo in cui è stato utilizzato il vaccino Ma5 e soprattutto rispetto al gruppo di controllo non vaccinato e sottoposto al *challenge*. Nel gruppo 2CV infatti, si sono osservate zone con assenza di ciglia, disorientamento ciliare, apici delle ciglia uniti tra loro dal muco ed ipertrofia delle cellule caliciformi.

Nel gruppo 3 CNVCh le lesioni osservate sono state molto più gravi e sono state caratterizzate da

disepitelizzazione, perdita delle ciglia e presenza di zone di erosione sulla mucosa.

Discussione

L'integrità dell'epitelio respiratorio e la conservazione della funzionalità della clearance ciliare, confermata anche dalle foto al microscopio elettronico a scansione, rappresentano sicuramente una valida barriera al virus di campo e ad agenti opportunisti secondari. Rimane da determinare se questa integrità è sinonimo di assenza di viremia e di colonizzazione degli organi bersaglio. Infatti, l'immunità locale a livello tracheale potrebbe non rappresentare l'unico fattore in grado impedire la viremia, e, ad esempio la colonizzazione renale. Sono in corso prove tese alla ricerca dell'antigene virale negli organi bersaglio mediante metodiche di immunostochimica.

E' opportuno comunque sottolineare che, in assenza di un presidio specifico per la variante 624/I, ed in considerazione dei gravi danni che questo virus provoca in campo, l'impiego della vaccinazione combinata H120 - 793/B, risulterebbe se non altro utile in caso di circolazione attiva del virus variante 624/I.

Bibliografia

- 1) Capua I., Gough R.E., Mancini M., Casaccia C., Weiss C. (1993). A "novel" infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. J. Vet. Med. Ser. B, 41, 83-89.
- 2) Capua I., Mawditt K., Cavanagh D., Gough R.E. (1999) Serological and molecular characterisation of infectious bronchitis virus strains isolated between 1996 and 1997 in Italy. Atti 37° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 1-2 Ottobre 1998 Sel. Vet. (8/9) 639-644
- 3) Cavanagh D., Davis P.J., Cook J.K.A. (1992). Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. Avian Pathology, 21, 401-408
- 4) Cislighi G., Martino B.A., Zanella A. (1997) Bronchite infettiva aviaria : persistenza nel nostro paese del virus nefropatogeno sierotipo AZ 23/74. Atti 35° Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 25-26 Settembre 1997 Sel. Vet., (8/9) 597-605
- 5) Cook J.K.A., Orbell S.J., Woods M.A., Huggins M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathology , 28, 477-485
- 6) Gough R.E., Cox W.J., Gutierrez E. MacKenzie G., Wood A.M., Dagless M.D. (1996) Isolation of "variant" strains of infectious bronchitis virus from vaccinated chickens in Great Britain. Veterinary Record, 139, 552
- 7) Gough R.E., Randall C.J., Dagless M.D., Alexander D.J., Cox W.J., Pearson D. (1992) A " new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Veterinary Record 130, 493-494
- 8) Parson D., Ellis M.M., Cavanagh D., Cook J.K.A. (1992) Characterisation of an infectious bronchitis virus from vaccinated broiler breeders. Veterinary Record. 131, 408-411
- 9) Pascucci S. (1995) Alcune considerazioni sulla bronchite infettiva e la sua evoluzione in Italia. Atti del convegno: "Bronchite infettiva: Un problema in evoluzione. Sierotipi italiani e problemi di campo". Bologna 12 settembre 1995
- 10) Zanella A., Coaro R., Fabris G., Marchi R., Lavazza A. (2000) Avian infectious bronchitis: isolation of apparently new variant in Italy. Veterinary Record 146, 191-193

Tabella 1: Risultati della prova di cross protezione in vivo

Table 1: results of *in vivo* cross protection trial

	H120 ad 1 giorno di vita + IB 4/91 a 14 giorni di vita			H120 ad 1 giorno di vita + Ma5 a 18 giorni di vita			Controllo non vaccinato sottoposto a <i>challenge</i>		
	Media del punteggio di ciliostasi	% di animali protetti	Indice di protezione	Media del punteggio di ciliostasi	% di animali protetti	Indice di protezione	Media del punteggio di ciliostasi	% di animali protetti	Indice di protezione
4° gg. PI	1,75	100	-	19	75	-	20,25	25	-
7° gg. PI	3,25	100	-	12	75	-	36	0	-
Totale	2,50	100	91,1	15,5	75	45	28,1	12,5	0