



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

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



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

***“Malattie metaboliche
e tecnopatie”***

Relazioni e Comunicazioni

**Forlì,
3-4 ottobre 2002**

Relazioni

	Pag.
1) M. Lilburn (<i>Ohio State University – Ohio – USA</i>) FATTORI METABOLICI CHE CONDIZIONANO LA PRODUZIONE AVICOLA COMMERCIALE: SVILUPPO EMBRIONALE E CRESCITA NEL PERIODO POST SCHIUSA	5
2) R. Julian (<i>University of Guelph - Ontario- Canada</i>) CAUSE METABOLICHE DI DISORDINI MUSCOLO-SCHELETRICI NEL POLLO E NEL TACCHINO	7
3) L. Berg (<i>Faculty of Veterinary Medicine Swedish University of Agricultural Science – Skara - Sweden</i>) DERMATITE PODALE NEL BROILER E NEL TACCHINO: EPIDEMIOLOGIA ED EFFICACIA DEGLI INTERVENTI	13
4) P. Massi (<i>Sezione Diagnostica di Forlì - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna</i>) MALATTIE METABOLICHE E TECNOPATIE IN ITALIA: IL PUNTO DELLA SITUAZIONE, LA DIAGNOSTICA DI LABORATORIO E LE STRATEGIE DI CONTROLLO	16

Comunicazioni

	Pag.
1) M. Sega, M.C.Castello USO DI LATTOBACILLI COME PROBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO DEL GALLO E DELLA GALLINA RIPRODUTTORI PESANTI	21
2) G. Di Modugno, A. Parisi, A. Camarda, F. Capuano, D. Di Modugno TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI GALLINE OVAIOLE DELL'ITALIA MERIDIONALE	23
²³ 3) T. Rampin, Z. Bernardi, G. Sironi, G. Manarolla, C. Natali, G. Grilli PRIMI RISULTATI SULLA PRESENZA DI ENTEROPATOGENI IN TACCHINI COMMERCIALI	25
4) L. Giovannetti, K. Duhaxhiu, M.C. Castello EFFICACIA DI AVINET® NELLA PREVENZIONE DELLE COLIBACILLOSI DEL BROILER E SUOI EFFETTI SU ALCUNE PERFORMANCES ZOOTECHICHE	27
5) L. Dipineto, G. Matteoli, F. Di Prisco, M.C. Landolfi, S. Montagnaro, L.F. Menna CONSIDERAZIONI SUGLI ISOLAMENTI DI <i>CAMPYLOBACTER</i> TERMOFILII OTTENUTI DAGLI ANIMALI E DALL'AMBIENTE: RISULTATI PRELIMINARI	29
6) A. Piccirillo, A. Baiano, A. Moreno Martin, M. Calabria, M. Sensale, S. Troisi, A. Fioretti, P. Cordioli INDAGINE SULLA PRESENZA DI ORTHO- E PARAMYXOVIRUS AVIARI IN UCCELLI SELVATICI DELLA CAMPANIA	31
7) M. Tamba, L. Taffetani, R. Calabrese, A. Santi, G. Tosi, R. Usberti EFFICACIA NEL BROILER DELLA VACCINAZIONE CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE CON VACCINI VIVI. ANALISI DI ALCUNI PARAMETRI PRODUTTIVI	33
8) M. Tamba, M. Cocchi, F. Ferri, P. Massi, A. Santi SORVEGLIANZA DELLE SALMONELLOSI NELLE OVAIOLE. RISULTATI DI UN'INDAGINE AL MACELLO	35
9) M.P. Franciosini, A.Lavazza, F.Parillo, G. Tacconi, G.Asdrubali RISULTATI PRELIMINARI SU ALCUNI ASPETTI PATOGENETICI DELL'INFEZIONE DA CIRCOVIRUS NEI PICCIONI DA CARNE	37
10) P. Casagrande Proietti, M.P. Franciosini, G. Predari, G.Asdrubali APPLICAZIONE DI PIANI VACCINALI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE NELLO STRUZZO (<i>Struthio camelus</i>): RISULTATI PRELIMINARI	39
11) L. Fiorentini, M.C.Castello PROPRIETA' ANTIBATTERICHE DI ALCUNI OLI ESSENZIALI	41
12) D. Da Ros, A. Marangon VALUTAZIONE FISICA E SENSORIALE DELLA CARNE DEL POLLO "A COLLO NUDO". CONFRONTO TRA DUE DIVERSE METODICHE DI INDAGINE REOLOGICA	43
13) A. Moreno Martin, L.J. Vinco, P. Cordioli, A. Lavazza DIAGNOSI DI MALATTIE ENTERICHE VIRALI NEL TACCHINO MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA ED IDENTIFICAZIONE DI CORONAVIRUS IN UN CASO DI ENTERITE IN TACCHINI	45
14) F. Comencini RACCOLTA, TRASPORTO E STOCCAGGIO DELLE SPOGLIE AVICOLE	47
15) F. Comencini SMALTIMENTO DELLE SPOGLIE AVICOLE: RENDERING O COMPOSTAGGIO?	48

16)	E. Bert, S. Cerruti Sola INDAGINE SULLA PRESENZA DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (Pbfd) IN PAPPAGALLI D'IMPORTAZIONE	51
17)	E. Foni, C. Chiapponi, D. Lori, M.A. De Marco, M. Delogu, E. Raffini, P. Massi APPLICAZIONE DI RT-PCR E METODICHE TRADIZIONALI NELLA RICERCA DI VIRUS INFLUENZALE DI TIPO A IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE IN ANATRE	53
18)	Persia D., Moreno Martin A., Pacciarini M.L., Cerioli M., Cordioli P., Massi P., Lavazza A. DIAGNOSI DI ADENOVIRUS AVIARI TIPO 2 MEDIANTE PCR	55
19)	F. Paganelli, P. Massi, G. Tosi APPLICAZIONE DEL METODO "POLYMERASE CHAIN REACTION" ALLA DIAGNOSI DI MYCOPLASMA GALLISEPTICUM E DI MYCOPLASMA SYNOVIAE	57
20)	M. A. De Marco, M. Delogu, E. Catelli, C. Terregino, V. Guberti SIEROPREVALENZE NEI CONFRONTI DI <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> E <i>MYCOPLASMA SYNOVIAE</i> RILEVATE IN EMILIA ROMAGNA IN FAGIANI A VITA LIBERA E ALLEVATI	59
21)	L. Fiorentini, P. Massi, G. Tosi APPLICAZIONE DEL SISTEMA AUTOMATIZZATO (VIDAS [®]) PER LA RICERCA DI <i>SALMONELLA SPP</i> : COMPARAZIONE CON IL METODO MICROBIOLOGICO TRADIZIONALE	61
22)	E. Catelli, M. Cecchinato, M. Delogu, P. De Matteo, M.A. De Marco, G. Ortali, P. Pesente, L. Sarti, C. Franciosi INFEZIONE DA PNEUMOVIRUS AVIARE NEL TACCHINO DA CARNE E NEL BROILER: INDAGINI DI CAMPO	63
23)	F. Paganelli, P. Massi, G. Tosi IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO CON LA POLYMERASE CHAIN REACTION	65
24)	R. Pezzotti, E. Cavallone, G. Grilli, D. Gallazzi MONITORAGGIO DEL CS-137 E STATO SANITARIO DI AVIFAUNA MIGRATORIA DI PROVENIENZA EST-EUROPEA	67
25)	F. Paganelli, P. Massi, G. Tosi, L. Fiorentini NESTED-PCR PER SIEROTIPIZZAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE	69
26)	M. Rondena, C. Giudice, T. Rampin, G. Cammarata, R. Lucchini SEGNALAZIONE DI CASI DI CECITA' A PRECOCE INSORGENZA IN PULCINI	71
27)	V. Spagnolo, Z. Bernardi, S. Paltrinieri INDAGINI BIOCHIMICHE CLINICHE IN TACCHINI COMMERCIALI: RISULTATI PRELIMINARI	73
28)	S. Ferrarini, F. Mutinelli, V. Poli INDAGINE SULLE CAUSE DI MORTALITA' IN GABBIA DI BROILER LEGGERI ALLA VISITA PRE-MACELLAZIONE	75
29)	S. Bertuzzi, D. Matteucci EFFETTI IN CAMPO DEL FORMYL SC [®] , UNA MISCELA DI ACIDI MICROINCAPSULATI, SU OVARITI E COLISETTICEMIA NELLA GALLINA OVAIOLA.	77
30)	G. Tosi, P. Massi, F. Paganelli, A. Lavazza ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI REOVIRUS IN CORSO DI SINDROME DA MALASSORBIMENTO NEL BROILER	79

RELAZIONE 1

FATTORI METABOLICI CHE CONDIZIONANO LA PRODUZIONE AVICOLA COMMERCIALE: SVILUPPO EMBRIONALE E CRESCITA NEL PERIODO POST SCHIUSA (Metabolic Factors Influencing Commercial Poultry Production: Embryonic Development and Early Post-Hatch Growth)

M.S. LILBURN

*Department of Animal Sciences Ohio State University/OARDCWooster, OH 44691
(traduzione a cura di Antonio Lavazza)*

INTRODUZIONE

Nel contesto della produzione avicola commerciale sono stati attuati, nell'ultimo ventennio, una serie di cambiamenti radicali sia nelle tecniche di management che nella qualità e tipo di prodotti. Il sensibile aumento del peso corporeo in funzione dell'età (curva di crescita) e l'aumento sproporzionato della massa muscolare di alcuni muscoli, tipo i pettorali, hanno indotto un effetto diretto sulla fisiologia di questi uccelli.

In concomitanza con le modifiche dei genotipi di polli e tacchini, si è, infatti, passati ad allevare gli animali in strutture (incubatoi, allevamenti, macelli etc) sempre più grandi, con una sempre più pressante enfasi sugli aspetti commerciali e sull'efficienza produttiva. Sono quindi stati sviluppati degli standards di riferimento per la "situazione normale" che costituissero i parametri cui attenersi in ogni fase della produzione, con la convinzione che ogni variazione rispetto a questi valori può indurre uno stato di crisi. A livello di incubatoio, queste variazioni possono essere dovute a fattori quali età del gruppo di riproduttori, fertilità e schiusa totale delle uova fertili. Lo scopo di questo lavoro è di presentare una rassegna dei fattori metabolici e fisiologici che influenzano lo sviluppo embrionale e la fase di crescita precoce post-schiusa, e descrivere le modalità attraverso le quali possiamo trasferire questi risultati nella pratica produttiva commerciale.

SVILUPPO EMBRIONALE

Il tuorlo delle uova di pollo e tacchino contiene elevate quantità di lipidi e proteine che sono nutrienti chiave durante la fase di sviluppo embrionale. Il colesterolo è presente nel tuorlo come colesterolo libero e durante la fase di incubazione il colesterolo viene assunto dalla membrana del sacco vitellino ed esterificato con gli acidi grassi del tuorlo dall'enzima Acyl-CoenzymeA: Cholesterol Acyltransferase (Shand et al., 1993; Ding and Lilburn, 1995). Il colesterolo esterificato e gli altri lipidi sono incorporati nelle lipoproteine embrionali ed i lipidi che essi trasportano, principalmente trigliceridi (TG), rappresentano la principale sorgente energetica per lo sviluppo degli embrioni.

Mentre il periodo di incubazione varia da 21 a 28 giorni a seconda della specie, il periodo di massimo trasferimento di lipidi dal tuorlo all'embrione è tra 15 e 21 gg di incubazione nel pollo e 22-28 gg nel tacchino. Questo è anche il medesimo periodo durante il quale si osservano i maggiori effetti ambientali (es. età dei riproduttori, dimensione dell'uovo etc) e genetici. Applegate e Lilburn (1996) hanno dimostrato che, all'interno di un gruppo di uova di uguale classe di peso, i pulcini nati da galline vecchie (55 sett.) erano significativamente più pesanti (3-4%) di quelli nati da femmine più giovani (37 sett.). Queste differenze sono in parte dovute ad una minor efficienza, nei riproduttori più giovani, del sistema di trasferimento dei lipidi all'embrione (Applegate e Lilburn, 1998). Inoltre, non sono state evidenziate differenze sostanziali, fra le diverse linee genetiche di tacchini, che pure possono mostrare differenze sensibili in taglia di peso corporeo e dimensione delle uova (25%), nel peso dell'embrione senza tuorlo fino al 22 gg di incubazione, ad ulteriore testimonianza e dimostrazione dell'importanza delle ultime fasi di incubazione nella crescita complessiva dell'embrione.

SVILUPPO DELL'INTESTINO

E' ben descritto in letteratura come, durante l'incubazione, l'intestino sia uno degli ultimi organi a svilupparsi e ciò ha un senso se si pensa che la principale sorgente energetica dell'embrione è rappresentata dai lipidi del tuorlo (Uni et al., 1996; Applegate et al., 1999).

Lo sviluppo dell'intestino continua anche dopo la schiusa e, in rapporto al peso corporeo, nei pulcini rappresenta l'organo a più rapida crescita nei primi 4-6 gg dopo la schiusa (Pinchasov e Noy, 1994; Sell et al., 1991). Nel pollo, anche se il massimo livello di crescita relativa viene raggiunto a 7 gg di età, la maturità funzionale a questa età è di gran lunga inferiore a quella osservata a 21 gg (Noy and Sklan, 1995). Il processo di maturazione avviene in funzione sia di modificazioni morfologiche che fisiologiche e in taluni casi può rappresentare un limite per la crescita precoce ottimale (Konarzewski et al., 1990). In concomitanza con il processo di maturazione dell'intestino nella fase precoce post schiusa, si ha una proliferazione cellulare che coinvolge sia gli enterociti dei villi sia le cellule delle cripte, e questo porta ad un raddoppio dell'altezza dei villi nel breve volgere di 7 gg nei pulcini (Applegate et al., 1999).

CONDIZIONI METABOLICHE DEI PULCINI ALLA SCHIUSA

Come già detto nel precedente paragrafo, la risorsa energetica primaria degli embrioni durante lo sviluppo sono gli acidi grassi che derivano dai lipidi del tuorlo, in aggiunta ad una certa quota di glucosio prodotta per gluconeogenesi a partire dalle proteine del tuorlo. E' opinione comune che i lipidi residui del sacco vitellino costituiscono una risorsa alimentare nei primi giorni post-schiusa. Nel residuo del sacco vitellino dei pulcini ci sono meno di 1 gr di trigliceridi e 400 mg di fosfolipidi (PL); ciò significa, in pratica, che l'energia derivante dai TG residui corrisponde a malapena all'energia di mantenimento necessaria per 1-2 giorni al massimo (Lilburn, 1998).

Noy et al. (1996) hanno anche dimostrato che non si ha assunzione finale dei lipidi residuali del tuorlo se non dopo che l'animale ha iniziato ad alimentarsi, e quindi si è ipotizzato che i fosfolipidi residuali potrebbero andare a costituire i fosfolipidi di membrane delle nuove cellule.

Alla schiusa, la "macchina metabolica" passa immediatamente da un processo basato essenzialmente sull'utilizzo di lipidi all'uso di glucosio e alla glicolisi. E' proprio questo uno dei principali cambiamenti di cui dobbiamo tenere conto nella definizione di pacchetti nutrizionali ottimali per i pulcini alla schiusa. Nel tacchino, l'attuale processo di schiusa può essere estremamente dispendioso in termini di utilizzo energetico e, in rapporto a quando la schiusa viene tolta dall'incubatoio, un elevato numero di pulcini potrebbe già essere schiuso da lungo tempo (anche 48 ore) prima che gli animali inizino ad alimentarsi e ad abbeverarsi. Questa era una delle ipotesi incluse in una serie di esperimenti descritti da Turner et al. (1999 a,b). In quegli studi, i pulcini appena schiusi avevano libero accesso all'acqua ed all'alimento entro 4 ore post schiusa (FED) o mantenuti in gabbie riscaldate per 48 ore prima di alienarli e abbeverarli (FASTED). I pulcini sono stati alimentati con diete contenenti o un'alta percentuale di carboidrati disponibili (60%, CHO) o con un'elevata percentuale di grasso sotto forma di grasso animale-vegetale al 10% (FAT) o di trigliceridi a media catena contenenti principalmente acidi grassi C8 (MCT). Tutti i dati sono stati espressi come giorni "post-feeding" piuttosto che come età cronologica. Entrambi i pulcini FED e FASTED avevano meno di 10 mg di glicogeno /g di fegato al giorno 1 "post feeding" al punto che è lecito assumere che il contenuto di glicogeno nei pulcini alla schiusa è pressoché minimo. Con entrambi i tipi di trattamento dietetico, i pulcini alimentati con la dieta CHO mostravano un significativo aumento del glicogeno epatico, a 2 gg post-feeding, rispetto a quelli alimentati con FAT. I pulcini FASTED alimentati con dieta CHO mostravano anche un aumento significativo delle concentrazioni di glucosio plasmatico, sempre in confronto a quelli alimentati con la dieta FAT. Tutto ciò indica che i processi di regolazione del glucosio erano differenti in funzione della possibilità o meno di accesso all'acqua ed al cibo subito dopo la schiusa. Quale controprova di ciò sono stati anche condotti i test di tolleranza al glucosio. I pulcini alimentati con la dieta MTC davano una risposta simile a quella dei pulcini alimentati con dieta FAT. Le diete CHO sono risultate molto più digeribili sia della dieta FAT che MCT, sebbene la digeribilità apparente degli acidi grassi polinsaturi della dieta FAT fosse > 80%. Ciò suggerisce che gli oli vegetali possono rappresentare una sorgente di lipidi altamente utilizzata dai giovani pulcini e conferma i risultati di Renner e Hill (1960) e Carew et al. (1972).

Bibliografia

1. Applegate, T.J. and M.S. Lilburn, 1996. Independent effects of hen age and egg size on incubation and poult characteristics in commercial turkeys. *Poultry Sci.* 75:1210-1216.
2. Applegate, T.J. and M.S. Lilburn, 1998. Effect of hen age, body weight and age at photostimulation. 2. Embryonic characteristics of commercial turkeys. *Poultry Sci.* 77:439-444.
3. Applegate, T.J., J.J. Dibner, M.L. Kitchell, Z. Uni, and M.S. Lilburn, 1999. Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poult. *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B* 124:381-389.
4. Carew, L.B., R.H. Machemer, Jr., R.W. Sharp, and D.C. Foss, 1972. Fat absorption by the very young chick. *Poultry Sci.* 51:738-742.
5. Ding, S.T. and M.S. Lilburn, 2001. The developmental expression of acyl-coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase in the yolk sac membrane, liver, and intestine of developing embryos and posthatch turkeys. *Poultry Sci.* 79:1460-1464.
6. Ding, S.T., K.E. Nestor, and M.S. Lilburn, 1995. The concentration of different lipid classes during late embryonic development in a random bred turkey population and a subline selected for increased body weight at sixteen weeks of age. *Poultry Sci.* 74:374-382.
7. Konarzewski, M., C. Lilja, J. Kozłowski, and B. Lewonczuk, 1990. On the optimal growth of the alimentary tract in avian post-embryonic development. *J. Zool. Lond.* 222:89-101.
8. Lilburn, M.S., 1998. Practical aspects of early nutrition for poultry. *J. Appl. Poult. Res.* 7:420-424.
9. Noy, Y. and D. Sklan, 1995. Digestion and absorption in the young chick. *Poultry Sci.* 74:366-373.
10. Noy, Y., Z. Uni, and D. Sklan, 1996. Routes of yolk utilization in the newly-hatched chick. *Br. Poult. Sci.* 37:987-996.
11. Pinchasov, Y. and Y. Noy, 1994. Early postnatal amylolysis in the gastrointestinal tract of turkey poults *Meleagris gallopavo*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A:221-226.
12. Renner, r. and F.W. Hill, 1960. The utilization of corn oil, lard, and tallow in young chicks. *Poultry Sci.* 39:849-854.
13. Sell, J.L., C.R. Angel, F.J. Piquer, E.G. Mallarino, and H.A. Al-Batshan, 1991. Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. *Poultry Sci.* 70:1200-1205.
14. Shand, J.H., D.W. West, R.J. McCartney, R.C. Noble, and B.K. Speake, 1993. The esterification of cholesterol in the yolk sac membrane of the chick embryo. *Lipids* 28:621-625.
15. Turner, K.A., T.J. Applegate, and M.S. Lilburn, 1999 a. Effects of feeding high carbohydrate or high fat diets. 1. Growth and metabolic status of the posthatch poult following immediate or delayed access to feed. *Poultry Sci.* 78:1573-1580.
16. Turner, K.A., T.J. Applegate, and M.S. Lilburn, 1999 b. Effects of feeding high carbohydrate or fat diets. 2. Apparent digestibility and apparent metabolizable energy of the posthatch poult. *Poultry Sci.* 78:1581-1587.
17. Uni, Z., Noy, Y. and D. Sklan, 1996. Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. *Br. Poultry Sci.* 36:63-71.

RELAZIONE 2

CAUSE METABOLICHE DI DISORDINI MUSCOLO-SCHELETRICI NEL POLLO E NEL TACCHINO (Metabolic causes of musculoskeletal disorders in chickens and turkeys)

RICHARD JULIAN

*Pathobiology Department, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1
(traduzione a cura di Antonio Lavazza)*

ANOMALIE GENETICHE E CONGENITE (DI SVILUPPO)

Molte anomalie scheletriche sono osservabili negli embrioni allorché le uova embrionate non schiuse vengono rotte. Deformità agli arti e torcicollo sono occasionalmente visibili in pulcini nei vassoi di schiusa. Scoliosi e cifosi sono più frequenti. Questi difetti possono essere genetici o congeniti e i difetti congeniti possono avere un'origine metabolica. Gli animali con torcicollo presentano difficoltà nell'alimentarsi. La scoliosi non causa solitamente problemi ma può essere associata ad un incremento delle deformità di tipo "valgismo-varismo".

DIFETTI ACQUISITI

INTRODUZIONE

Molte delle deformità agli arti e dei problemi di zoppie (*lameness*) che si riscontrano nei polli da carne sono correlati ad una rapida crescita e sono, di conseguenza, molto più evidenti nei maschi. Un rallentamento della crescita, soprattutto nei primi 15-20 gg di vita, riduce di molto l'incidenza di deformità ossee angolari (valgismo-varismo), discondroplasia (*kinky back*) e rotture tendinee, che probabilmente costituiscono il 70-90% delle deformità agli arti e zoppie in polli da carne, allevati in condizioni di elevata densità e con razioni alimentari adeguate. Il rallentamento della crescita è meno efficace nei tacchini, sebbene riduca la discondroplasia e le morti per problemi cardiovascolari. Un aumento dell'esercizio fisico dopo le 8 settimane riduce le zoppie nel tacchino.

La deformità degli arti del tacchino può essere il risultato di una crescita non uniforme della superficie di accrescimento (*growth plate*) o di una posizione anormale dell'arto, ma, tuttavia, è più probabilmente il risultato di una tensione del muscolo o del tendine sulle articolazioni o sull'osso, che spinge le ossa fuori asse o causa una curvatura delle ossa molli durante la loro crescita. La deformità ossea angolare al garretto è una causa comune di zoppia nel tacchino, che sembra essere correlata sia ad una crescita rapida sia ad un incremento della stazza corporea e del peso. Si presenta, nel tacchino, ad un'età maggiore rispetto al pollo. Una grave zoppia nei tacchini (*shakey-leg lameness*) è causata dal dolore tendineo derivante dalla mancanza di attività correlata alla dermatite podale o a ulcerazioni derivanti dalle scadenti condizioni della lettiera. Si verifica di solito quando il tendine inizia ad ossificarsi.

La cartilagine articolare dei tacchini a rapida crescita è sottile e, come in tutti gli uccelli, non è prodotta da un centro di ossificazione nell'epifisi. Una necrosi ischemica o focale avascolare (osteochondrosi) di questa cartilagine frequentemente esita in una lesione articolare. Fratture per avulsione e danni legamentosi all'articolazione intertarsale e all'articolazione femoro-tibiale sono spesso non rilevate durante un'indagine necroscopica di tacchini con zoppie. Fratture spontanee del femore si verificano sporadicamente nei maschi pesanti, occasionalmente come problema in un gruppo o in un'azienda.

Deficit nutrizionali possono essere causa di zoppie. Tali carenze possono essere il risultato di una concentrazione insufficiente di un nutriente in funzione della curva di crescita degli uccelli, motivo per cui di solito si manifesta prima nei maschi. Il problema potrebbe essere una scarsa qualità delle vitamine, un errore nell'aggiunta di vitamine alla premiscela, un' inadeguata miscelazione dell'alimento, o può essere secondario ad una lesione dell'epitelio intestinale indotta da virus o da batteri, che determina una maldigestione ed un ridotto assorbimento delle sostanze nutritive.

Le lesioni muscolari sono rare nel pollame; tuttavia si osservano miopatie nutrizionali (deficienza di selenio), da sforzo, quali, ad esempio, la miopatia pettorale profonda, e l'edema dell'arto del tacchino (*turkey leg edema*) e tossiche (ionofori). La rottura del muscolo peroneo, nel punto dove i tendini si ossificano, è causa di riforma alla macellazione dei tacchini ma non causa zoppia. La rottura spontanea del tendine gastrocnemio sopra il garretto è rara nei tacchini.

A) PROBLEMI AGLI ARTI ASSOCIATI CON LA CONSERVAZIONE DELLE UOVA E L'INCUBAZIONE

Tanto più le uova sono conservate prima dell'inizio dell'incubazione, tanto più numerosi sono i pulcini che saranno scartati e le deformità articolari osservate. Questo può essere associato ad un'anormale posizione del tuorlo dopo un lungo periodo di conservazione. La bassa umidità (aumento di perdita dei liquidi) aumenta il problema.

Temperatura di incubazione e deformità degli arti. La temperatura di incubazione influenza l'indice metabolico e le deformità articolari nel pulcino e nel pollame in genere, in quanto l'indice metabolico condiziona lo sviluppo dell'embrione. Una temperatura fredda dal giorno 2 al giorno 9 può causare un aumento del piegarsi delle dita, deformità ossee angolari, scivolamento tendineo (*spraddled, slipped tendon*) e rotazione della tibia. Un eccessivo riscaldamento dal giorno 10 può avere un effetto ancora più serio su queste deformità ed in particolare nei tacchinotti. La dimensione delle uova influenza la temperatura interna delle uova, e le uova più grandi sono più inclini a surriscaldarsi alla crescita dell'embrione a causa del calore sviluppato dall'embrione che si sviluppa.

B) DEFORMITÀ AGLI ARTI CORRELATE ALLA CRESCITA E ALL'AMBIENTE

- 1) **Dita piegate** (*crooked toes*) **dita arrotolate** (*curled toes*). Il "dito arrotolato" è un'anomalia di sviluppo comune sia nei giovani tacchini in crescita sia nei polli, che colpisce pochi soggetti nella maggior parte dei gruppi. Le dita sono piegate sia lateralmente, sia medialmente su un piano orizzontale. L'esame ispettivo rivela un arrotolarsi delle falangi. L'illuminazione con infrarossi e la pavimentazione in rete sembrano aumentarne l'incidenza. Al contrario l'uso dei posatoi la ridurrebbe. Questa condizione deve essere differenziata dalle dita piegate a causa di carenza di riboflavina nei soggetti giovani, nei quali le dita sono piegate centralmente e la lesione primaria è a livello di fasci nervosi periferici.
- 2) **Scivolamento tendineo** (*slipped tendon*). Il tendine del gastrocnemio scivola fuori dai condili della tibia distale cosicché l'animale perde il controllo dell'arto distale. Lo "scivolamento" primario del tendine si può verificare anche in assenza di anomalie ossee o cartilaginee e non necessariamente deriva da una carenza di manganese o altre sostanze. La resistenza dell'osso è normale. E' causa di solo l'1-3% casi di zoppia nel pollo ed è raro nelle altre specie aviarie.
- 3) **Spondilolistesi** (*kinky-back*). E' la dislocazione ventrale dell'estremità anteriore dell'articolazione della 4° vertebra toracica che porta ad un'inclinazione verso l'alto dell'estremità anteriore che va, a sua volta, a comprimere il midollo spinale. Il danno al midollo comporta una paralisi posteriore parziale. I boiler colpiti si siedono sulla coda con gli arti estesi o flaccidi su di un lato. Questa lesione deve essere differenziata dalla scoliosi (che di solito non causa sintomi clinici) e dall'osteomielite o osteocondrosi/discondroplasia della stessa vertebra, che, andando a comprimere il midollo spinale, causa segni clinici simili, soprattutto nei maschi. La dislocazione si può verificare anche tra altre vertebre cervicali e toraciche.
La spondilolistesi è una lesione frequente, più comune nei broiler di sesso femminile che nei maschi. Non è osservata nei tacchini. Gli uccelli ammalati sono impossibilitati a raggiungere l'acqua ed il cibo e devono essere allontanati e soppressi. Il rallentare la crescita, particolarmente nei primi 14-21 gg di vita, ne riduce l'incidenza.
- 4) **Discondroplasia tibiale** (*tibial dyschondroplasia-TD*), **osteocondrosi** (*osteochondrosis*). La proliferazione con mancanza di rimozione della cartilagine preperforica avascolare viene detta discondroplasia. Se la lesione è modesta, la modificazione ossea è minima. Se la lesione è estesa. L'estremità dell'osso colpito si allarga, si indebolisce e si può piegare verso l'indietro. La corteccia si assottiglia e l'osso si può fratturare spontaneamente o alla macellazione. Quando l'estremità dell'osso si allarga e si indebolisce, l'osso si comprime quando soggetti di peso elevato stanno in piedi. Questi soggetti sentono dolore quando si muovono e pertanto tendono subito a sedersi nuovamente. Quando la crescita ossea rallenta in prossimità della maturità, la lesione può regredire o occasionalmente si sviluppa necrosi attorno alla cartilagine. Tutto ciò esita nella necrosi dell'osso lungo o in una frattura e conseguente grave zoppia. Dal 30 al 50% del pollame da carne soffre di discondroplasia, ma la zoppia si ha solo quando è presente debolezza ossea, necrosi, deformità o frattura.
La causa è multifattoriale, ma una rapida crescita, in particolare in assenza di un lungo periodo di riposo giornaliero, ed uno scompenso elettrolitico (equilibrio anioni/cationi) sono fattori primari. Gli anioni devono essere aumentati e i cationi diminuiti. Anche alcune micotossine e sostanze chimiche possono aumentarne l'incidenza. La discondroplasia è causa del 5-25% delle zoppie in polli da carne, tacchini e anatre con però livelli occasionalmente maggiori nei tacchini. Causa fino al 50% di zoppie in alcuni gruppi, in quei paesi dove si fa uso di proteine animali nella razione. Si può ridurre l'incidenza di discondroplasia mediante alcalinizzazione della razione, rimpiazzando 1 kg di NaCl con 2 kg di NaHCO₃ per tonnellata di alimento. L'aggiunta da 5 a 10 µg di 1,25(OH)₂ colecalciferolo/kg di alimento può prevenire la TD.
- 5) **Valgismo-varismo** (*valgus-varus deformity-VVD*); **deformità ossea angolare** (*angular bone deformity*); **gambe ruotate** (*twisted legs*). VVD è la deviazione laterale o mediale dell'estremità tibiotarsica distale con una corrispondente deviazione del metatarso e una deviazione secondaria e talora anche il completo scivolamento del tendine gastrocnemio. Gli uccelli colpiti hanno gli "arti ad arco" (*bow-legged*) o le "gambe ad X" (*knock-kneed*), fino a che non vanno "off their legs". Questa alterazione si verifica nei soggetti a rapida crescita da pochi giorni di vita fino alla macellazione. Le superfici di crescita dell'osso sono normali nelle porzioni distali tibiotarsiche ma il metatarso prossimale può essere allargato. I legamenti intertarsali si stirano e l'articolazione diventa mobile. La resistenza dell'osso è normale allorché compare zoppia ma si possono osservare fratture spontanee lungo la superficie di crescita dell'osso tra la tibia e le ossa tarsali attaccate. Non è nota l'eziologia ma questa alterazione è certamente correlata a regimi alimentari elevati ed a rapida crescita. Nel tacchino questa alterazione si osserva ad una età maggiore rispetto al pollo, di solito intorno alle sei settimane di età. La VVD si manifesta anche nei ratiti ed in alcuni uccelli negli zoo (cicogne ed aironi) quando sono alimentati in maniera spinta con mangime per tacchini altamente proteico, a dimostrazione del fatto che la VVD non ha una base genetica. L'eziologia potrebbe essere correlata ad una crescita ineguale delle due ossa tarsali, alla superficie di accrescimento all'estremità distale della tibia, o ad un'asimmetrica tensione tendinea per la crescita rapida o ad un indebolimento delle ossa. Potrebbe anche essere causata da una qualche carenza di vitamina B.
E' causa frequente di zoppia nel tacchino, inducendo dal 15 al 30% delle deformità agli arti. E' la causa più frequente di zoppia nei broilers, inducendo fino al 60% delle malattie scheletriche.
Il ridurre la curva di crescita nei primi 10-14 gg di vita riduce l'incidenza di questa deformità nei polli da carne. Anche la riduzione della % di proteina nell'alimento è efficace ma comporta anche una riduzione degli indici di conversione. Un aumento di esercizio fisico è più efficace nei tacchini, forse perché comporta un aumento della resistenza dell'osso.

C) CAUSE FISICHE E MECCANICHE DI ZOPPIE E DI ALTERAZIONI MUSCOLO-SCHELETRICHE

- 1) **Distacco epifisale** (*epiphyseal separation*). Quando, in sede necroscopica, si disarticolano gli arti di giovani broiler a rapida crescita normali, spesso la cartilagine articolare rimane attaccata alla testa femorale e ai trocanteri tramite la capsula articolare lasciando evidente la superficie di accrescimento liscia e lucente. Talvolta anche parte della cartilagine di accrescimento viene strappata, lasciando così comparire la superficie rugosa, irregolare e simil-necrotica dell'osso subcondrale. Alcuni descrivono questo normale distacco post-mortale come "necrosi della testa del femore" (*femoral head necrosis*) ma è un aspetto del tutto normale nei broilers.
I broiler che sono catturati e tenuti per una gamba per essere messi nelle ceste e trasportati al macello, possono sbattere violentemente e cercare di divincolarsi, così determinando il distacco epifisale al femore prossimale- Questi animali vanno incontro a sanguinamento, evidente nella parte distale del femore, e possono morire per shock ipovolemico od essere scartati alla macellazione.
- 2) **Fratture**. Le galline ruspanti e che utilizzano posatoi possono frequentemente subire delle fratture traumatiche alle ossa degli arti inferiori o delle ali. Se le galline soffrono di osteoporosi, le fratture sono più frequenti e si possono osservare anche in galline in gabbia, come fratture spontanee o indotte da traumi, della colonna vertebrale o degli arti. Molte fratture possono derivare dalle manipolazioni durante il carico a fine ciclo produttivo quando le galline vengono inviate al macello.
Tacchini di linee pesanti possono presentare fratture spontanee del femore e questo è di solito associato a carenze di calcio.
- 3) **Miopatia da sforzo** (*exertional myopathy*). La miopatia conseguente ad attività muscolare si osserva quando si ha un'ipossia muscolare locale, e/o i prodotti del metabolismo muscolare (acido lattico) sono in quantità superiore a quanto è in grado di rimuovere il sistema vascolare, determinando così un accumulo locale con conseguente danno muscolare e vascolare. In seguito, per l'attivazione di mediatori dell'infiammazione, si ha edema e risposta vascolare. Le lesioni macroscopiche iniziali sono rappresentate da pallore con edema o trasudato sieroso emorragico. Microscopicamente si osserva rigonfiamento, degenerazione, necrosi e mineralizzazione delle fibre muscolari con edema, emorragie ed infiltrazione di eterofili e macrofagi.
- 4) **Miopatia pettorale profonda** (*deep pectoral myopathy*). E' il risultato del batter d'ali. E' una miosite "compartimentale". Si ha degenerazione, necrosi e fibrosi del muscolo pettorale profondo (supracoracoideo) negli uccelli da carne di linee pesanti (polli e tacchini). La maggior perdita economica è legata allo scadimento o riforma delle carcasse alla macellazione. Il muscolo pettorale profondo agisce nel sollevamento delle ali. La miopatia può essere mono- o bilaterale con interessamento di tutto il muscolo, della parte centrale o di due terzi dello stesso. Nelle forme iniziali il muscolo colpito è pallido, disteso e edematoso. Poiché il muscolo si dilata ma resta circoscritto dalla fascia muscolare densa che lo riveste, diventa ischemico e va incontro a necrosi. In seguito il tessuto colpito appare nettamente distinto da quello sano funzionale adiacente ed alla fine viene incapsulato dando origine ad una massa muscolare secca, necrotica di colore verdastro avvolta in una spessa capsula fibrosa.
Il verificarsi di questa forma può essere limitato mediante un'attenta manipolazione degli animali suscettibili al fine di prevenire un eccessivo sbattere d'ali, in particolare quando gli animali sono tenuti in mano e trasportati. Può anche essere associato a zoppia poiché gli uccelli usano maggiormente le ali per muoversi. La recettività a questa forma è ereditaria e pertanto la selezione genetica può rappresentare un metodo a lungo termine per diminuirne l'incidenza. L'aggiunta di selenio, vitamina E o metionina, non ha modificato l'influenza. Una miosite virale del muscolo supracoracoideo può causare infiammazione e distensione con conseguente necrosi ischemica, che genera un quadro di miopatia simile. Una miopatia pettorale profonda è stata descritta in Gran Bretagna in associazione con un'infezione da virus IBV.
- 5) **Rottura del tendine gastrocnemio** (*rupture of the gastrocnemius tendon*). E' comune nei polli da carne, in particolare nei broiler e nei riproduttori pesanti. Solitamente la rottura è primaria ed è causata da un eccessivo peso sui tendini che hanno un'inadeguata robustezza alla tensione. La rottura del tendine di un arto provoca un eccessivo stress sull'altro tendine e quindi si verifica spesso una rottura bilaterale. Gli uccelli colpiti sono zoppi o "seduti sui garretti" (in pratica strisciano sul terreno). L'emorragia conseguente alla rottura è visibile come un'area di colore blu, rosso o verde nella zona sopra il garretto sulla parte posteriore dell'arto; solitamente comporta la toelettatura della porzione interessata alla macellazione (*red-leg, green-leg*). Il tendine rotto può essere palpato come un'area ispessita (che equivale ad un tentativo dell'organismo di aumentare la resistenza del tendine) sulla parte posteriore dell'arto sopra il garretto. Questa alterazione è rara nei tacchini.
- 6) **Pododermatite e ulcere podali** (*pododermatitis and foot ulcers*). L'azione irritante delle feci e della lettiera determina un ispessimento, per una progressiva ipercheratosi ed una decolorazione della superficie plantare pianta e del garretto. Se le feci aderiscono alla superficie plantare si può avere necrosi ischemica e ulcerazione, una lesione dolorosa che provoca zoppia. Questa forma si previene evitando che la lettiera diventi bagnata e appiccicosa. L'uso della sabbia nella lettiera può essere d'aiuto nella prevenzione ma può nel contempo causare problemi digestivi se ingerita. Se la sabbia è pulita si può aggiungere del truciolo a 2-3 settimane. Nel tacchino, la pododermatite è una comune causa predisponente di zoppia.
- 7) **Zoppia dell'arto tremolante** (*shakey-leg lameness, shakey-leg syndrome*). Si tratta di una grave zoppia, principalmente dei tacchini maschi di 7-8 settimane di età, che si manifesta con riluttanza degli animali ad alzarsi e camminare. Può rappresentare un serio problema in alcuni gruppi. Quando vengono spinti ad alzarsi i tacchini stanno fermi inclinati in avanti e tremano doloranti. L'eziologia specifica è sconosciuta ma il dolore è causato da una tendinite. Si manifesta con più frequenza ed in maniera evidente quando i tendini iniziano a ossificare. Viene associata a condizioni di lettiera bagnata o appiccicosa che causano dermatite plantare e ulcere, che rendono doloroso camminare. Di conseguenza i tacchini trascorrono la maggior parte del tempo

accovacciati e inattivi; col tempo si irrigidiscono, mostrano dolore muscolare e tendineo e diventano sempre più restii a muoversi. Una volta che si realizza questa situazione si crea un circolo vizioso tale per cui l'irrigidimento ed il dolore si autoalimentano. La maggior parte dei tacchini guarisce quando la crescita ossea rallenta, ma spesso il gran tempo trascorso accovacciati sul terreno crea condizioni favorevoli all'insorgenza di lesioni secondarie al piede, al garretto e all'anca. Quale prevenzione di zoppie e problemi articolari nel tacchino sono determinanti delle buone condizioni della lettiera e delle strategie di management (programmi luce) che facilitino il movimento degli animali.

- 8) **Rotazione della tibia (*rotated tibia*)**. E' una rotazione esterna (torsione) dell'asse tibiotarsico che esita nella deviazione laterale o posteriore del piede. L'articolazione del garretto è normale e non si ha né dislocazione del garretto né curvatura dell'osso tibiotarsico distale. L'osso è dritto e solido. La lesione è unilaterale e l'arto colpito è spesso abdotto, generando una postura come di chi sta a calcioni (*straddle-legged*). Sono primariamente colpiti i tacchini di 2-14 settimane di età ed è stata segnalata un'incidenza del 15% in alcuni gruppi. Viene associata a poco movimento e a pavimenti scivolosi in incubatoio. I soggetti colpiti devono essere scartati.

D) CAUSE TOSSICHE DI ZOPPIA

Le tossine possono causare in coordinazione o zoppia agendo sui nervi, i muscoli o le ossa. Un esempio di tossine che possono agire sul sistema nervoso centrale o periferico è rappresentato da alti livelli di organofosfati di acido arsenilico (organofosfati a lunga azione), piombo, mercurio e selenio. Il Lasalocid, un anticoccidico ionoforo può causare un danno neuronale simile a quello indotto da una deficienza di riboflavina o dalla malattia di Marek. La tossina botulinica può indurre una paralisi simile alla forma paralisi transitoria nella Marek.

Le tossine che producono specifiche lesioni ossee sono rare. Un eccesso di fluoro può causare modificazione ossee. Molte sostanze nutritive come la vitamina A ed il magnesio sono tossici se assunti in dosi eccessive ed alcuni possono causare lesioni alle superfici di accrescimento e conseguenti zoppie.

Tossicità da ionofori. Un livello eccessivo di ionofori può causare danno muscolare associato a debolezza e paralisi. Ciò si verifica più spesso nei tacchini che nei polli. I tacchini riproduttori sono particolarmente sensibili agli ionofori.

I **semi della pianta del caffè** (*Cassia* sp.) possono causare debolezza, in coordinazione e miopatia tossica. Le lesioni sono evidenti nei muscoli scheletrici ed occasionalmente nel muscolo cardiaco.

La **tossicità da selenio** può indurre lesioni ai nervi ed ai muscoli. La lesione muscolare assomiglia a quella da deficienza da selenio (NSD).

E) ALIMENTAZIONE: CARENZE, ECCESSI E SQUILIBRI

Le carenze e gli squilibri alimentari possono causare debolezza degli arti e zoppie inducendo lesioni all'osso, alla cartilagine, ai muscoli, ai nervi o alla cute.

1) Carenze nutritive che causano problemi ossei e cartilaginei

- 1.1) Il **rachitismo** è una malattia che colpisce solitamente i giovani uccelli di età inferiore a tre settimane. E' più frequente nei maschi e nei tacchini. Può essere causato da carenza di vit D₃ o fosforo o calcio o da squilibrio calcio/fosforo. Gli uccelli colpiti sono riluttanti a muoversi e a camminare in quanto vogliono evitare di caricare tutto il peso su di un solo arto (camminano come se i piedi fossero ulcerati). Possono anche stare distesi ed essere incapaci di alzarsi. Le ossa e il becco sono molli e gommosi (si piegano senza rompersi). I soggetti colpiti possono presentare deformità sternali e pelviche. Le epifisi sono allargate, in modo particolare le costole a livello di articolazione vertebrale e costocondrale. La corticale ossea è sottile, la superficie di accrescimento è allargata e la zona ipertrofica degenerante (*degenerating hypertrophic zone - DHZ*) e la spongiosa primaria sono allungate nel rachitismo da deficienza di fosforo (eccesso di calcio, di conseguenza le fratture sono comuni. Nel rachitismo da carenza di calcio (eccesso di fosforo) la zona preipertrofica proliferante (*proliferating-prehypertrophic-P-PHZ*) è allungata e disorganizzata e le colonne cartilaginee della DHZ e la spongiosa primaria sono accorciate e pertanto ci può essere un aumento del tessuto fibroso. Le spicole ossee (trabecole) sono circondate da un incremento di osteoide. Il rachitismo da carenza di Vit. D₃ è simile al rachitismo da carenza di calcio con riassorbimento della cartilagine e delle spicole ossee. Con eccessi di fosforo ci può essere un iperparatiroidismo secondario alimentare e osteodistrofia fibrosa.

La correzione della carenza risolve il problema. L'aggiunta di 5 - 10µg di 1,25(OH)₂ cholecalciferolo/kg di alimento può risultare utile. Sia la Vit. D₃ che l'1,25(OH)₂ cholecalciferolo sono tossici se somministrati in eccesso.

1.2) Osteomalacia/Osteoporosi/Osteopenia

Le ovaiole in produzione possono andare incontro ad un eccessivo utilizzo di calcio e sviluppare **osteomalacia**. Questo si può verificare per l'incapacità di metabolizzare una quantità sufficiente di Ca o a causa di un contenuto inadeguato nella dieta di Calcio, Vit. D₃ o fosforo. Quando le ovaiole entrano in produzione smettono di produrre osso scheletrico e producono solo osso midollare. Se tale tipo di osso va incontro a deplezione per la formazione del guscio delle uova. e non è disponibile calcio nella dieta, la gallina inizia a riassorbire calcio dall'osso scheletrico. Una frattura scheletrica è frequente causa di mortalità in linee genetiche ad alta produzione (oltre il 90% di produzione nei primi 3-4 mesi). Molte ovaiole vengono a morte per ipocalcemia acuta mentre è in formazione un uovo. Queste sono galline sane, pienamente produttive, trovate morte con un uovo nella camera ovigera. Per diagnosticare questi casi bisogna tagliare il femore con le forbici nella parte centrale, apprezzando così la fragilità del femore e verificare l'assenza pressoché totale dell'osso midollare.

Fatica dell'ovaiola in gabbia (Cage Layer Fatigue-CLF), osteoporosi: l'osteoporosi da carenza di fosforo in ovaiole ad alta produzione viene detta CLF. Il fosforo è necessario per ricostruire l'osso in quanto sia il calcio che il fosforo vengono riassorbiti e rimpiazzati durante il ciclo di deposizione/non deposizione. Siccome le galline assumono fosforo dalle feci, è necessario somministrare una maggior quantità di fosforo quando le galline sono in gabbia. Sintomi e lesioni sono simili alla deficienza di calcio ma l'osteodistrofia fibrosa è più evidente. Anche la frattura della spina dorsale è più frequente.

La **carenza di Vitamina D₃** esita in una forma di osteoporosi nelle ovaiole, in quanto condiziona il metabolismo del calcio. Di solito è un problema di gruppo e può essere associato a scarsa qualità del guscio.

Prevenzione dell'osteoporosi. Nella maggior parte di gruppi l'osteoporosi è il risultato dell'elevata produzione. Per prevenire l'osteoporosi, senza ridurre il livello di produzione, le galline devono assumere una quantità sufficiente di calcio dal tratto enterico per la formazione del guscio delle uova. La formazione del guscio delle uova richiede che una quantità di 2 grammi di calcio venga utilizzata per ciascun uovo in un lasso di tempo di 18-20 ore ogni 24 ore. Al momento massimo di produzione del guscio dell'uovo la gallina assume e utilizza tutto il calcio libero nel sangue circolante ogni 15 minuti. Questa quantità di calcio deve essere rimpiazzata o la gallina muore. Poiché la fase di maggior produzione dell'uovo avviene nelle ore notturne, dobbiamo essere sicuri del fatto che una quantità sufficiente di calcio facilmente assorbibile sia disponibile nel tratto enterico durante la fase di formazione del guscio.

- I) Circa due settimane prima del presunto momento di deposizione del primo uovo, il livello alimentare di calcio deve essere aumentato per avere la certezza che sia l'osso scheletrico che midollare siano pronti per la produzione dell'uovo. Tuttavia il livello alimentare di calcio non va aumentato troppo presto in quanto può causare problemi renali e diarrea.
 - II) Le galline devono essere alimentate alla fine del periodo notturno per produrre l'albume per l'uovo successivo. Alimentare gli animali una seconda volta giusto prima dell'inizio del periodo notturno fornirà il calcio nel momento più adatto per la formazione del guscio.
 - III) L'utilizzo di particelle di calcio di elevate dimensioni (più grandi di 0.75 mm), che sono trattenute nello stomaco, garantiscono che adeguate quantità di calcio siano disponibili durante la fase di produzione del guscio.
 - IV) Particelle di calcio di elevate dimensioni provenienti dal guscio di conchiglie possono essere migliori di calcio di altra natura.
 - V) L'aggiunta del 1% (10 kg per tonnellata) di calcio extra sotto forma di particelle di grandi dimensioni, una o due volte la settimana, posto direttamente sull'alimento nella mangiatoia (*top dressing*) permette alle galline che necessitano di maggiori quantità di calcio di assumerlo a volontà. Questo dovrebbe iniziare nel momento in cui le galline aggiungono il picco di produzione e continuare per 3-4 mesi.
 - VI) La vitamina D₃ ed il fosforo devono essere in quantità adeguata e prontamente disponibili.
 - VII) La capacità di restituire una maggior quantità di calcio nell'osso midollare, con rapidità, durante la fase di non produzione del guscio o nel giorno di non produzione può essere influenzata dalla genetica. Una selezione di questo carattere può essere utile a prevenire l'osteoporosi nelle ovaiole in deposizione.
- 1.3) **Perosi (osteochondrosi nutrizionale).** La perosi consiste in un'anormalità della superficie di accrescimento, indotta da una carenza di manganese (o colina), che causa un allargamento e una deformità delle ossa dell'articolazione intertarsale con dislocazione secondaria del tendine gastrocnemio negli uccelli in crescita. Il termine perosi è usato anche per ogni altro disturbo dell'articolazione intertarsale, e molte mancanze nutrizionali sono state prese in considerazione quale possibile causa. Questo termine non ha più un significato specifico e viene spesso usato per descrivere dei broilers che presentano una deformità ossea angolare o uno scivolamento tendineo.
- 1.4) **Osteochondrosi nutrizionale (nutritional osteochondrosis).** La carenza di numerosi elementi del complesso vitamina B: biotina, folacina, niacina, acido pantotenico, singolarmente o in associazione tra loro, può indurre delle alterazioni della superficie di accrescimento negli uccelli in crescita, che nel pollo assomiglia alla perosi o alla deformità ossea angolare, mentre nei tacchinotti assomiglia alla TS65. Anche la carenza di zinco può indurre lesioni simili. La zoppia in questi casi è solitamente secondaria alla deformazione. La carenza cronica di vitamina A o la tossicità da vitamina A possono indurre anomalie ossee.
- 1.5) **Carenza di zinco.** Nell'uomo, nei mammiferi e negli uccelli la carenza di zinco determina un accorciamento delle ossa lunghe e un allargamento dei garretti. I danni da carenza di zinco sono maggiori in presenza di elevate dosi di calcio.

2) Carenze nutrizionali che colpiscono il muscolo

- 2.1) **Miopatia nutrizionale (nutritional myopathy).** La distrofia muscolare nutrizionale (NMD) del pollame e degli anatidi è sensibile al selenio. La cisterna può avere effetto benefico. Lesioni da NMD sono state osservate nei muscoli scheletrici, nel cuore e nella muscolatura liscia (stomaco muscolare e intestino) di anatre, tacchini e polli. Arsenico, zinco, rame e altri metalli si comportano da antagonisti e possono causare un aggravamento dei focolai di NMD. Se sono colpiti i muscoli scheletrici, gli uccelli mostrano debolezza degli arti o paralisi. Le lesioni macroscopiche sono simili a quelle della NMD dei mammiferi con focolai o striature biancastre. Le lesioni microscopiche consistono in rigonfiamento focale o generalizzato, edema ialinizzazione, mineralizzazione, degenerazione e lisi con infiltrazione macrofagica ed esterofila. Una ipercellularità per proliferazione dei nuclei del sarcolemma può essere evidente se sia osservata rigenerazione. Nella maggior parte dei Paesi il selenio viene aggiunto alla razione in ragione di 0.1-0.4 ppm.

3) Carenze nutrizionali che colpiscono i nervi

- 3.1) **Carenza di riboflavina** (*riboflavin deficiency*), **paralisi del dito arrotolato** (*curly-toe paralysis*). La carenza di riboflavina determina un edema dei nervi periferici e induce zoppia e paralisi nei giovani polli, tacchini e negli anatidi. Gli uccelli sono maggiormente suscettibili nelle prime due settimane di vita e diventano via via più resistenti con l'aumentare dell'età. Di frequente un'alta percentuale di polli o tacchini mostrano segni clinici con debolezza degli arti e dita tipicamente arrotolate ventralmente e internamente. Il trattamento con riboflavina o vitamine B contenenti riboflavina solitamente determina un rapido miglioramento nel giro di 24 ore.
- 3.2) **Carenza di vitamina E; encefalomalacia**. L'encefalomalacia è un danno capillari cerebrali indotto dai radicali liberi, che esita in necrosi avascolare, in particolare a livello cerebellare. I polli e tacchini colpiti presentano una varietà di sintomi clinici e di debolezza degli arti, in funzione della localizzazione delle lesioni a livello cerebellare.

4) Carenze nutrizionali che colpiscono la pelle

Carenze di biotina e acido pantotenico possono causare dermatite intorno agli occhi, bocca e sulle zampe. Una grave carenza di biotina può causare dermatite podale e debole zoppia. Anche la carenza di zinco può esitare in dermatite.

LETTURE CONSIGLIATE

1. Classen, H.L. (1992) Management factors in leg disorders. In: Whitehead, C.C. (ed.). Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. Carfax Publishing Co., Abingdon, UK, pp.195-211.
2. Classen, H.L. and Riddell, C. (1989) Photoperiodic effects on performance and leg abnormalities in broiler chickens. Poultry Sci 68, 873-879.
3. Cook, M.E. and Bai, Y. (1994) Factors influencing growth plate cartilage turnover. Poultry Sci 73, 889-896.
4. Farquharson, C. and Jefferies, D. (2000) Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. Poultry Sci 79, 994-1004.
5. Gregory, N. C. and Wilkins, L. J. (1992) Skeletal damage and bone defects during catching and processing. In: Whitehead, C.C. (ed.). Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. Carfax Publishing Co., Abingdon, UK, pp. 313-328.
6. Gough, R. E., Randall, C. J., et al. (1992) A "new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Vet Record 130, 493-494.
7. Hester, P. Y. (1994) The role of environment and management on leg abnormalities in meat-type fowl. Poultry Sci 73, 904-915.
8. Hocking, P.M. (1992) Musculo-skeletal disease in heavy breeding birds. In: Whitehead, C.C. (ed.). Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. Carfax Publishing Co., Abingdon, UK, pp. 297-309.
9. Julian, R.J. (1984a) Valgus-varus deformity of the intertarsal joint in broiler chickens. Can Vet J 25, 254-258.
10. Julian, R.J. (1984b) Tendon avulsion as a cause of lameness in turkeys. Avian Dis 29, 244-249.
11. Julian, R.J. (1985) Osteochondrosis, dyschondroplasia, and osteomyelitis causing femoral head necrosis in turkeys. Avian Dis 29, 854-866.
12. Julian, R.J. (1994) Metabolic disorders and welfare of broilers. Proc. 9th European Poultry Conference, Glasgow. UK Branch WPSA, Walker & Connell Ltd, Darvel, UK, pp. 64-69.
13. Julian, R.J. (1998) Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers. Poultry Sci 77, 1773-1780.
14. Julian, R.J. and Gazdzinsky, P. (2000) Lameness and leg problems. World Poultry. Elsevier, the Netherlands, August, 2000 pp. 24-31.
15. Rath, N.C., Huff, G.R., Huff, W.E. and Balog, J.M. (2000) Factors regulating bone maturity and strength in poultry. Poultry Sci 79, 1024-1032.
16. Reddi, A.H. (2000) Initiation and promotion of endochondral bone formation by bone morphogenetic proteins: potential implication for avian tibial dyschondroplasia. Poultry Sci 79, 978-981.
17. Rennie, J.S., Whitehead, C.C. and Thorp, B.H. (1993) The effect of dietary 1,25-dehydroxycholecalciferol in preventing tibial dyschondroplasia in broilers fed on diets imbalanced in calcium and phosphorus. Bri J Nut 69, 809-816.
18. Riddell, C. (1992) Non-infectious skeletal disorders of poultry: an overview. In: Whitehead, C. C. (ed.). Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. Carfax Pub Co., Abingdon, UK, pp. 119-145.
19. Riddell, C. (1996) Skeletal system. In: Riddell, C. (ed) Avian Histopathology 2nd edn. Am. Assoc. Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 45-60.
20. Riddell, C. (1997) Developmental, metabolic and other noninfectious disorders. In: Calnek, B.W. (ed) Diseases of Poultry, 10th edn., Iowa State University Press, Ames, pp. 913-950.
21. Thorp, B.H. (1992) Abnormalities in the growth of leg bones. In: Whitehead, C.C. (ed.). Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. Carfax Publishing Co., Abingdon, UK, pp.147-166
22. Thorp, B. H. (1994) Skeletal disorders of the fowl: a review. Avian Pathol, 23, 203-236.
23. Thorp, B.H. (2001) Diseases of the musculoskeletal system. In: Jordon, F., Pattison, M., Alexander, D., Faragher, T. (eds). Poultry Diseases 5th ed. Wb Saunders, London, pp.437-454.
24. Thorp, B.M., Jakowlew, S.B. and Goddard, C. (1995) Avian dyschondroplasia: local deficiencies in growth factors are integral to the aetiopathogenesis. Avian Pathol, 24, 135-148.

RELAZIONE 3

DERMATITE PODOALE NEL BROILER E NEL TACCHINO: EPIDEMIOLOGIA ED EFFICACIA DEGLI INTERVENTI (Footpad dermatitis in broilers – epidemiology and effects of intervention)

CHARLOTTE C. BERG

Dept. of Animal Environment and Health, Swedish University of Agricultural Sciences, P.O. Box 234, SE - 532 23 Skara, Sweden, phone +46 511 67207, fax +46 511 67204, e-mail Lotta.Berg@hnh.slu.se
(traduzione a cura di Alessandra Piccirillo)

INTRODUZIONE

Attualmente esistono circa 150 produttori commerciali di broiler in Svezia. I broiler di solito sono macellati tra i 28 ed i 50 giorni d'età, con una media di circa 36 giorni. Gli animali più vecchi di solito sono porzionati e venduti come "fresco", mentre quelli più giovani sono venduti come carcasse intere congelate o ulteriormente lavorati. In Svezia vengono allevati e macellati annualmente circa 70 milioni di broiler. L'allevamento del broiler è al chiuso in moderni capannoni isolati con pavimento in cemento. Tutti i capannoni sono provvisti di riscaldamento, ed i tipi di lettiera più utilizzati sono costituiti da trucioli di legno e paglia. La lettiera viene eliminata e rimpiazzata ad ogni ciclo ed il capannone completamente pulito tra ogni gruppo.

Nell'industria avicola svedese vengono attuati molti programmi sanitari. Tutti i volatili importati ed i gruppi di riproduttori ("parent" e "grandparent") sono routinariamente esaminati per molte malattie contagiose, batteriche e virali. Tutti gli allevatori di broiler prendono parte al programma svedese di controllo profilattico per la salmonella (*Swedish Prophylactic Salmonella Control Programme*) (Wierup et al. 1995). Il programma contiene misure profilattiche quali la biosicurezza che prevede il "tutto pieno-tutto vuoto", barriere igieniche e pulizia e disinfezione. Esso, inoltre, comprende il monitoraggio dei gruppi di broiler per la Salmonella prima della macellazione. L'incidenza della Salmonella in Svezia è stata inferiore allo 0.5% per molti anni (Lindqvist 1997). Il programma ha anche lo scopo di diminuire l'incidenza di *Campylobacter* nei broiler, che attualmente è di circa il 9% (Berndtson 1997). L'uso di additivi alimentari ad azione antibatterica quali promotori della crescita è stato bandito dal 1986 in Svezia, ma i broiler normalmente ricevono mangimi contenenti anticoccidici.

Esiste anche un programma di monitoraggio per una malattia non contagiosa: la dermatite podale. Questo lavoro descrive l'epidemiologia della dermatite podale nel broiler e gli effetti degli interventi.

DERMATITE PODOALE DEL BROILER – MOTIVI DI PREOCCUPAZIONE

La dermatite podale, conosciuta anche come pododermatite plantare, è una condizione caratterizzata da lesioni sulla faccia ventrale dei piedi (Nairn & Watson, 1972; Schmidt & Luders, 1976; Wise, 1978; Martland, 1985; Schulze Kersting, 1996). La dermatite podale del broiler è una dermatite da contatto (Nairn and Watson, 1972; Greene et al., 1985) che colpisce le regioni plantari dei piedi. Negli stadi precoci, si osserva depigmentazione della cute. Istologicamente si può osservare ipercheratosi e necrosi dell'epidermide. Nei casi gravi, le lesioni podali possono causare dolore, che insieme ad uno scadimento dello stato di salute, rappresentano un problema di benessere. Harms and Simpson (1975) hanno riportato che gli animali affetti da dermatite podale presentano un'andatura barcollante, ed Hester (1994) ha notato come la dermatite podale possa indurre gli animali a zoppiare. Ciò nonostante è molto difficile identificare in un gruppo la zoppia causata dalla dermatite podale. Poiché i broiler affetti da dermatite Podale di solito manifestano lo stesso tipo di lesione su entrambi i piedi, quelli gravemente colpiti raramente zoppicano, ma piuttosto rimangono immobili.

Oltre agli aspetti di benessere animale, la dermatite podale è una patologia importante per l'industria di carne avicola per molti altri motivi. E' stato riportato che i broiler con grave dermatite podale mostrano un diminuito incremento ponderale (Martland, 1985; Ekstrand & Algers, 1997), che si pensa sia il risultato dell'inappetenza indotta dal dolore (Martland, 1985). Se il problema è diffuso nel gruppo, ciò può portare a perdite economiche da parte dell'allevatore. Poiché i gruppi con un'elevata incidenza di dermatite podale spesso presenta anche un'elevata prevalenza di altri tipi di dermatite da contatto, come la bursite sternale (*breast blisters*) e le bruciature del garretto (*hock burns*) (Greene et al., 1985; Martland, 1985), oltre alla riduzione del peso corporeo, il malessere può influenzare negativamente la rendita produttiva di questi gruppi (Wise, 1978; Cravener et al., 1992). Infine, le lesioni possono rappresentare una porta d'entrata per i batteri, i quali possono diffondere per via ematogena e causare lesioni articolari e bassa qualità del prodotto in altri modi (Schulze Kersting, 1996). Negli avicoli, gli stafilococchi sono saprofiti a livello cutaneo. Gli stafilococchi causano infezioni secondarie nelle ulcere podali (Hester, 1994) e sono coinvolti in un gran numero di differenti complessi di malattie (McCullagh et al., 1997). Lo *Staphylococcus aureus* è importante nell'igiene della carne avicola per la sua potenziale produzione di enterotossine, che possono causare tossinfezione alimentare negli uomini (Devriese, 1980).

Il nostro gruppo di ricerca ha condotto vari studi riguardanti l'epidemiologia della dermatite podale nei polli da carne in Svezia. Gli studi si concentravano sulla presenza della dermatite podale in allevamenti commerciali di polli (e tacchini) da carne in Svezia, identificando i fattori di rischio endogeni ed esogeni e valutando la funzione dello stato di salute del piede (*footpad health*) come indicatore dello standard manageriale, igienico e di allevamento.

EPIDEMIOLOGIA DELLA DERMATITE PODOALE NEL BROILER

All'inizio del nostro lavoro, nella metà degli anni '90, la prevalenza della dermatite podale in broiler svedesi al momento della macellazione era stimata di circa il 10% per le lesioni gravi ed il 10-35% per le lesioni lievi (Ekstrand et al., 1998).

Una prevalenza notevolmente più elevata di dermatite podale fu riscontrata in gruppi allevati su lettiera umida piuttosto che in quelli allevati su lettiera asciutta. Inoltre, una prevalenza significativamente più elevata delle lesioni fu riscontrata in gruppi allevati su strati spessi di lettiera piuttosto che su strati sottili (Ekstrand et al. 1997). L'utilizzo di truciol di legno come materiale determinava una più bassa prevalenza della dermatite podale rispetto alla paglia. È da notare che al tempo dell'indagine, non veniva ancora utilizzato il riscaldamento del pavimento nell'allevamento del broiler. Dopo che altri studi avevano segnalato una migliore performance e migliore stato di salute del piede dei tacchini allevati su pavimento riscaldato, questa pratica è divenuta comune anche nell'allevamento del broiler, e gli allevatori hanno segnalato un miglioramento dello stato di salute del piede anche in questi volatili.

Il sistema di abbeveraggio, sia per quanto riguarda il gocciolamento che per il consumo di acqua, può significativamente influenzare la prevalenza della dermatite podale (Ekstrand et al. 1997). Un sistema di abbeveratoi a tazza, invece che di abbeveratoi a goccia (*nipples*), può perdere più facilmente acqua e dunque determinare lettiera umida. Similmente, un sistema che determina un aumentato consumo di acqua può causare feci umide e lettiera umida. Molti studi hanno anche dimostrato un'associazione tra lettiera umida e forma dell'abbeveratoio (Elson, 1989; Tucker & Walker, 1992; Cholocinska et al., 1997), da ricondurre principalmente alla maggiore o minore possibilità di dispersione dei differenti tipi di abbeveratoi.

Un fattore che influenza la qualità della lettiera è la condizione climatica, poiché un'elevata umidità relativa sia all'esterno (Payne, 1967; McIlroy et al., 1987) che all'interno del capannone (Payne, 1967; Weaver & Meijerhof, 1991) può determinare una cattiva qualità della lettiera. Nel nostro studio è stato notato un rilevante effetto stagionale sulla prevalenza della dermatite podale del broiler, con una più alta prevalenza riscontrata da ottobre a gennaio. Questi mesi sono quelli con la più elevata umidità relativa esterna in Svezia (Ekstrand & Carpenter, 1998), e si può concludere che gli attuali sistemi di ventilazione non sono sempre in grado di compensarla. Gli allevatori, inoltre, devono tenere in considerazione l'aumento dei costi per il riscaldamento, quando decidono di aumentare la ventilazione durante la stagione fredda.

La prevalenza e la gravità della dermatite podale dei broiler è diminuita con il tempo quando sono stati attuati programmi di sorveglianza (Ekstrand et al., 1998). Per i dettagli vedi in seguito.

Contrariamente a studi precedenti (Bruce et al., 1990), analizzando i dati del programma di stato di salute del piede non è stata dimostrata un'associazione tra l'età di macellazione e la dermatite podale o tra il sesso dell'animale e la prevalenza della dermatite podale (Ekstrand et al. 1998). Non è stata neanche rilevata alcuna associazione tra ibrido e dermatite podale del broiler (Ekstrand et al. 1998). Tuttavia, abbiamo riscontrato un'associazione tra gruppo integrato e tra mangimificio e dermatite podale del broiler. Altri AA. hanno suggerito che diete a base di soia possono contribuire a produrre una lettiera urticante (Nairn & Watson, 1972) o che l'utilizzo di mangime a base di soia nella dieta può determinare variazioni di consistenza delle feci, causando feci e lettiera viscosi e portando ad un aumento dell'incidenza della dermatite podale (Jensen et al., 1970). Tucker and Walker (1992) hanno evidenziato un effetto della qualità del grasso della dieta sulla friabilità superficiale della lettiera. In uno studio longitudinale McIlroy e collaboratori (1987) hanno riscontrato una notevole influenza del mangimificio sull'incidenza di lesioni al petto. L'effetto del gruppo integrato del macello può essere correlato alle differenze nello standard di ispezione attuato presso i vari macelli (Ekstrand et al., 1998).

PROGRAMMA DI SORVEGLIANZA - EFFETTI DEGLI INTERVENTI

Come affermato precedentemente, il principale fattore di rischio per la dermatite podale del broiler è la lettiera umida ed è stato dimostrato che ciò è dovuto a vari fattori di management, igiene ed allevamento, e quindi che le lesioni possono essere utilizzate come un indicatore dello standard di questi fattori. È stato applicato un programma di monitoraggio per la dermatite podale, nel quale ispettori addestrati classificano lo stato di salute del piede di ogni gruppo di broiler al momento della macellazione, in accordo ad un sistema di punteggio sviluppato dalla Swedish University of Agricultural Sciences. Il programma di monitoraggio è stato collegato ad un programma di ispezione, nel quale sono stati identificati i fattori di rischio negli allevamenti "problema" ed è stata intrapreso un considerevole intervento. (Ekstrand 1997, Berg 1998).

Lo scopo del programma sullo stato di salute del piede era quello di ridurre le lesioni podali gravi nei broiler allevati commercialmente, cioè di migliorare la salute e dunque il benessere degli animali. Un altro scopo del programma, che lo lega a quello del benessere, era di rendere più chiaro agli allevatori come le loro misure profilattiche ed il loro lavoro sul miglioramento del benessere animale in realtà riguardavano gli animali durante il periodo di accrescimento.

L'analisi dei dati ha dimostrato che la prevalenza e la gravità della dermatite podale nei broiler diminuivano col tempo quando iniziava il programma di monitoraggio. Quando il programma iniziò, la prevalenza delle lesioni gravi al momento della macellazione era dell'11% e dopo 2 anni diminuì al 6% (Ekstrand et al., 1998). Nel 1998, è ulteriormente diminuita al 5% ed è rimasta a quei livelli negli ultimi anni. È interessante notare che, quando sono stati messi al bando i mangimi a base di farina di carne ed ossa nell'UE, l'improvvisa necessità di cambiare la composizione della dieta ha portato a problemi nella qualità della lettiera e dunque ad un'aumentata prevalenza della dermatite podale segnalata al macello. I produttori di mangime, tuttavia, hanno affrontato correttamente il problema e nel giro di un paio di mesi la prevalenza è scesa al livello originario.

Così è stato dimostrato che questo tipo di programma di sorveglianza e ispezione può essere utilizzato con successo per ridurre l'incidenza delle lesioni podali nelle popolazioni di broiler, ed inoltre migliorare la salute ed il benessere degli animali (Berg, 1998).

Quando si sviluppa un programma di sorveglianza come questo, il sistema di feedback è molto importante (Algers & Berg, 2001). Ci sono vari modi in cui questo feedback può essere gestito. I programmi di salute e benessere animale sviluppati dall'industria possono determinare costi extra o ridotti per il tipo di prodotto in

questione (uova, latte o carne) a seconda di quanto siano soddisfatti gli standard. L'industria del broiler ha scelto un approccio leggermente differente, usando la densità del gruppo come modo di ricompensare i "buoni" allevatori. In breve, gli allevatori che partecipano ad un programma di benessere, incluso il programma di stato di salute del piede, possono adottare densità di gruppo più elevate (massimo 36 kg/m²) rispetto agli allevatori che non vi partecipano. Se il punteggio è troppo elevato, cioè se le lesioni - soprattutto quelle gravi - sono troppo prevalenti, in accordo ad una scala prefissata, l'allevatore viene costretto a diminuire la densità del gruppo fin quando il problema non si risolve. Così, è ancora una volta che si utilizza, indirettamente, il ritorno economico per incoraggiare gli allevatori a migliorare gli standard di benessere.

L'aspetto finanziario è importante. Per tutti i tipi di monitoraggio o programmi di sorveglianza deve essere effettuata un'analisi costo-beneficio, al fine di valutare il costo di applicazione del programma, incluse le misure che devono essere intraprese se la malattia è presente, e di pesare questi costi in confronto ai benefici dell'avere un livello inferiore di malattia. Tali analisi fanno parte del lavoro di routine quando si sviluppa, per esempio, un programma di eradicazione per una malattia contagiosa. Calcoli simili dovrebbero essere fatti anche per i programmi che hanno come finalità la riduzione dell'incidenza di malattie non contagiose (Algers & Berg, 2001). Tali analisi sono state condotte per il programma di salute del piede del broiler ed hanno dimostrato che il costo del programma viene compensato da un migliore tasso di accrescimento degli animali non colpiti dalla malattia (Ekstrand et al. 1998).

BIBLIOGRAFIA

1. Algers, B., Berg, C., 2001. Monitoring animal welfare on commercial broiler farms in Sweden. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science Supplementum 30: 88-92.
2. Berg, C. 1998. Footpad dermatitis in broilers and turkeys - prevalence, risk factors and prevention. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Veterinaria 36. PhD thesis.
3. Berndtson, E. 1997. Campylobacter i svensk slaktkycklingproduktion. Nordisk Konsulent og Veterinaerkursus, Ålborg. Ch. 6. (In Swedish)
4. 9(3): 523-538.
5. Cholocinska, A., Wezyk, S., Herbut, E. and Cywa-Benko, K. (1997). Effect of a broiler watering system on the hygienic quality of litter. 9th International Congress in Animal Hygiene, Helsinki. 301-304.
6. Cravener, T. L., Roush, W. B. and Mashaly, M. M. (1992). Broiler production under varying population densities. Poultry Science, 71(3): 427-433.
7. Devriese, L. A. (1980). Pathogenic staphylococci in poultry. Zootec International Genova, 9: 36-38.
8. Ekstrand, C. 1997. Monitoring broiler welfare during rearing and loading. Proceedings, Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Chester, p 144-152.
9. Ekstrand, C. and Algers, B. (1997). The effect of litter moisture on the development of foot-pad dermatitis in broilers. 11th International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest. 370.
10. Ekstrand, C. & Carpenter, T.E. 1998. Temporal aspects of footpad dermatitis in Swedish broilers. Acta Veterinaria Scandinavica 39, 229-236.
11. Ekstrand, C., Algers, B. & Svedberg, J. 1997. Rearing conditions and footpad dermatitis in Swedish broiler chickens. Preventive Veterinary Medicine 31, 167-174
12. Ekstrand, C., Carpenter, T.E., Andersson, I. & Algers, B. 1998. Prevalence and prevention of footpad dermatitis in broilers in Sweden. British Poultry Science 39, 318-324.
13. Elson, H. H. (1989). Drinker design affects litter quality. Poultry, 5(1): 8-9.
14. Greene, J. A., McCracken, R. M. and Evans, R. T. (1985). A contact dermatitis of broilers - clinical and pathological findings. Avian Pathology, 14(1): 23-38.
15. Harms, R. H. and Simpson, C. F. (1975). Biotin deficiency as a possible cause of swelling and ulceration of foot pads. Poultry Science, 54(5): 1711-1713.
16. Hester, P. Y. (1994). The role of environment and management on leg abnormalities in meat-type fowl. Poultry Science, 73(6): 904-915.
17. Jensen, L. S., Martinson, R. and Schumaier, G. (1970). A foot-pad dermatitis in turkey poults associated with soybean meal. Poultry Science, 49: 76-82.
18. Lindqvist, H. 1997. Antalet salmonellasmittade djurbesättningar är fortsatt lågt. Djuridiken / SJV(5): 6. (in Swedish)
19. Martland, M. F. (1985). Ulcerative dermatitis in broiler chickens: the effects of wet litter. Avian Pathology, 14(3): 353-364.
20. McCullagh, J. J., McNamee, P. T. and Ball, H. J. (1997). Application of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to the typing of *Staphylococcus aureus* isolates collected from broiler houses and hatcheries in Northern Ireland. 11th International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest. 50.
21. McIlroy, S. G., Goodall, E. A. and McMurray, C. H. (1987). A contact dermatitis of broilers - epidemiological findings. Avian Pathology, 16(1): 93-105.
22. Nairn, M. E. and Watson, A. R. A. (1972). Leg weakness of poultry: A clinical and pathological characterisation. Australian Veterinary Journal, 48(12): 645-656.
23. Payne, C. G. (1967). Factors influencing environmental temperature and humidity in intensive broiler houses during the post-brooding period. British Poultry Science, 8: 101-118.
24. Schmidt, V. and Lüders, H. (1976). Ulcerations of the sole and toe pads of fattened turkey cocks. Berlin München Tierärztlicher Wochenschrift, 89(3): 47-50.
25. Schulze Kersting, I. (1996). Untersuchungen zur Einstreuqualität und Leistung in der Broilermast in Abhängigkeit von der Besatzdichte. Institut für Tierernährung. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. (in German)
26. Tucker, S. A. and Walker, A. W. (1992). Hock burn in broilers. Recent advance in animal nutrition. Oxford: Butterworth Heinemann Ltd, 1992: 33-50.
27. Weaver, W. D. and Meijerhof, R. (1991). The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler chickens. Poultry Science, 70(4): 746-755.
28. Wierup, M., Engstrom, B., Engvall, A. & Wahlstrom, H. 1995. Control of Salmonella enteritidis in Sweden. Int. J. Food Microbiol. 25(3), 219-226.
29. Wise, D. R. (1978). Nutrition-disease interactions of leg weakness in poultry. Recent advance in animal nutrition. Oxford: Butterworth Heinemann Ltd, 1978: 41-57.

RELAZIONE 4

ALTERAZIONI METABOLICHE NEL POLLAME: INDAGINI DI CAMPO E DI LABORATORIO

P. MASSI, G. TOSI, F. PAGANELLI, L. FIORENTINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna - Sezione di Forlì

Parole chiave: alterazioni metaboliche, pollame, indagini di laboratorio

Dismetabolic syndrome in poultry industry: field and laboratory investigations

Keys Words: dismetabolic syndrome, poultry, laboratory investigations.

Correspondence: Paola Massi Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Forlì Via Marchini 1 - 47100 Forlì. E-mail forli@bs.izs.it

ALTERAZIONI METABOLICHE NEL POLLAME

I sistemi di management dell'allevamento avicolo intensivo sono cambiati e continueranno a cambiare in futuro. Materie prime per mangimi, accettabili solo alcuni anni fa, ora non sono più proponibili e non incontrano più il favore dei consumatori.

Allo stesso modo le linee genetiche attualmente allevate hanno parametri produttivi e riproduttivi superiori che richiedono un programma alimentare molto sofisticato e ben equilibrato.

Il settore zootecnico è stato sconvolto in questi ultimi anni da alcune importanti novità legislative:

- Nel 1999, l'Unione Europea, in risposta alle preoccupazioni dei consumatori sui patogeni antibiotico-resistenti, ha proibito l'uso della maggior parte dei promotori di crescita-antibiotici nel mangime. Anche i paesi che forniscono carne all'UE si sono velocemente uniformati a questa normativa. L'intera industria zootecnica risultò, comprensibilmente, preoccupata per questi provvedimenti che hanno rimosso, spesso senza evidenza scientifica, sostanze che avevano fortemente incentivato le performances zootecniche.
- In seguito al dilagante fenomeno della B.S.E. il Consiglio delle Comunità Europee il 4 dicembre 2000 (2000/766/CE) ha adottato la presente decisione: "*Gli Stati membri vietano la somministrazione di proteine animali trasformate ad animali d'allevamento che sono tenuti, ingrassati o allevati per la produzione di alimenti*".

Dal punto di vista dell'alimentazione ciò significa la totale rinuncia alle proteine di origine animale nella dieta, cui si accompagna spesso la rinuncia forzata ai grassi di origine animale.

SINDROME URATICA NEL POLLO DA CARNE

Cenni di fisiologia neonatale

Nelle prime tre settimane di vita del pulcino da carne il mangime contiene le seguenti materie prime: 32% di soia estrusa, 26% di mais, 13% di frumento, 2% di crusca, 15% di semola.

L'uso di sole proteine vegetali e di oli di semi e frutti è spesso causa di modifiche della composizione delle carcasse e del loro aspetto e richiede aggiustamenti maggiori rispetto al passato. Inoltre è maggiore il peso dei fattori anti-nutrizionali sul risultato zootecnico.

A causa della variazione alimentare e di un incremento nella velocità di accrescimento, crescerà sempre più l'importanza relativa dei primissimi periodi di vita. Infatti l'energia produttiva o netta non è una caratteristica della materia prima, ma in buona parte dipende dalla capacità dell'animale, dal suo grado di "efficienza energetica" (2). Lo sviluppo degli organi coinvolti nei **processi digestivi** è molto rapido nei pulcini da carne.

Circa il 25% delle proteine contenute nel sacco vitellino viene trattenuto nell'intestino e serve per lo sviluppo degli organi deputati alla digestione.

In genere tale crescita è massima tra i 6 e i 7 giorni di vita e si verifica in modo più rapido nel duodeno, digiuno e pancreas.

Le amilasi si attivano fra 2 e 7 giorni di vita mentre lipasi e tripsina sono attivate più precocemente a causa dell'elevato tenore di grassi e proteine del liquido vitellino.

Inoltre le linee a rapida crescita si caratterizzano per uno sviluppo importante del **tessuto muscolare** durante la prima settimana di vita. Le fibre muscolari si formano durante la vita embrionale ed il loro numero è già fissato al momento della schiusa. Le modificazioni post-natali riguardano le dimensioni delle fibre ed il numero dei nuclei presenti al loro interno. I processi di sviluppo muscolare sono concentrati nei primissimi giorni di vita del pulcino.

A differenza del tessuto digerente e di quello muscolare, il **sistema immunitario** si sviluppa lentamente durante la prima settimana di vita ed è strettamente legato all'ambiente d'allevamento.

Il rapido sviluppo degli apparati digerente e muscolare subito dopo la nascita pone il problema di una corretta ripartizione delle risorse alimentari tra le principali funzioni vitali del pulcino. Ci si chiede pertanto se il sistema immunitario possa essere penalizzato da una selezione troppo mirata allo sviluppo muscolare (1).

Descrizione della sindrome uratica ed indagini di laboratorio

Nel mese di gennaio del 2001 compare, improvvisamente, una sindrome uratica nel pollo da carne allevato intensivamente. La patologia si osserva fra l'ottavo e il quindicesimo giorno di vita.

I segni clinici si manifestano con mortalità improvvisa (0,3-0,5%), grave depressione e abbattimento dei soggetti che si presentano disoressici.

All'esame anatomo-patologico le lesioni macroscopiche consistono in disidratazione, carni scure, depositi di urati su tutti gli organi parenchimatosi e sulle sierose, grave nefrosi con accumulo di urati lungo gli ureteri.

Gli esami di laboratorio, eseguiti su diversi casi, consistono in accertamenti di tipo virologico tramite la tecnica di inoculazione (per via intravitellina e via allantoidea) di uova embrionate di pollo "specific-pathogen-free (SPF)" e tramite l'allestimento e l'inoculazione di colture primarie di fegato di embrione di pollo SPF di 13 giorni di vita.

Non sono mai stati evidenziati agenti virali causali.

La microscopia elettronica, condotta direttamente sul contenuto intestinale, non ha messo in evidenza la presenza di virus enterici.

Gli esami batteriologici sono sempre risultati negativi per agenti patogeni primari. Anche la ricerca di micotossine nel mangime ha dato esiti poco significativi e non confrontabili.

All'esame istologico (eseguito su organi prelevati durante gli esami autoptici) sono state descritte le seguenti lesioni: nefrite interstiziale, nefrosi con focolai di necrosi e focali depositi di urati; fegato congesto, necrosi epatiche e focali infiltrati rotondo cellulari nel miocardio.

Sono stati eseguiti due tentativi di riproduzione sperimentale della patologia: pulcini SPF allevati in isolatori sono stati infettati, all'età di 1 giorno di vita, con omogenati d'organo di embrioni SPF infettati materiale patologico prelevato in sede necroscopica. Dopo un mese dall'infezione, i pulcini sono stati soppressi e nessuno di essi presentava un quadro anatomo-patologico simile a quello descritto sopra. A partire dagli organi prelevati dai pulcini è stato allestito un omogenato da inoculare su uova embrionale di pollo SPF senza ottenere la riproduzione delle lesioni.

Pertanto è stata completamente scartata l'ipotesi di una eziologia virale e/o batterica di questa patologia.

L'esame virologico mediante la tecnica di inoculazione delle uova embrionale SPF di pollo ha presentato un comportamento anomalo. Tutti gli embrioni morti presentavano lo stesso quadro anatomo-patologico: embrione edematoso, necrosi epatiche, epatosplenomegalia, nefromegalia e cuore edematoso con necrosi. Inoltre la mortalità dell'embrione si presentava sempre più ravvicinata nel tempo, in rapporto al crescere del numero di passaggi eseguiti su uova embrionate SPF.

Le caratteristiche peculiari riscontrate con l'esame virologico tradizionale e la variazione della composizione dei mangimi avvenuta proprio nello stesso periodo in cui si sono verificati i primi casi di sindrome uratica, ha portato ad ipotizzare una eziologia di natura alimentare.

Per verificare questa ipotesi è stata valutata, come prima fase dello studio, la composizione in metil esteri degli acidi grassi derivati dai lipidi totali. Per questa valutazione sono stati confrontati gli embrioni di pollo SPF di controllo e gli embrioni di pollo SPF inoculati con l'omogenato d'organo di animali colpiti dalla sindrome uratica.

In particolare sono stati presi in considerazione il cuore, il fegato, ed il cervello degli embrioni di pollo SPF, essendo questi gli organi maggiormente coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi.

I primi studi sulla composizione degli acidi grassi hanno rilevato delle differenze compositive significative fra gli embrioni di controllo e quelli "trattati". L'osservazione di questi primi dati e, contemporaneamente, il cambiamento della composizione dei mangimi, ha incoraggiato l'ipotesi di una causa alimentare nella sindrome uratica del pollo da carne.

I dati mostrano infatti un aumento significativo del contenuto molare relativo dell'acido oleico: una sua variazione indica un'alterazione nella produzione e nel mantenimento degli acidi polinsaturi (PUFA).

E' inoltre osservabile un aumento significativo dell'acido linoleico e una diminuzione significativa del suo omologo superiore, l'acido arachidonico, così come sono presenti diminuzioni significative del contenuto molare relativo di altri PUFA.

Le variazioni osservate nei riguardi degli acidi grassi fanno supporre una modulazione della desaturasi, l'enzima chiave nel processo di formazione dei PUFA. Una sua diminuita attività determina infatti un rallentamento del flusso di produzione dei PUFA.

Le differenze osservate possono anche essere causa di fenomeni perossidativi a cui vanno incontro i PUFA.

Dalla perossidazione lipidica si ha una spirale di danni strutturali e funzionali a carico delle cellule e dei tessuti: minore sintesi di ATP, minore velocità di sintesi dei lipidi di membrana e aumento del calcio e del potassio endocellulare. Questa reazione a cascata ha fatto ipotizzare una possibile correlazione con il comportamento anomalo dell'uovo embrionato di pollo inoculato con i campioni in esame. A supporto dell'ipotesi legata alla perossidazione lipidica è stato di recente dimostrato che i polli digeriscono in maniera poco efficiente i grassi ossidati per cui si evidenzia un'effettiva diminuzione dell'energia metabolizzabile della dieta, cui consegue una minore crescita dei soggetti colpiti (6).

L'accumulo di composti ossidati spiegherebbe inoltre l'alterato metabolismo epatico con conseguenti lesioni degenerative a carico del fegato, spesso osservate nei casi esaminati.

SINDROME ENTERICA DEL BROILER

Nel periodo tardo inverno-primavera del 2002 si sono verificati diversi episodi di sindrome enterica nel pollo da carne con caratteristiche molto simili fra loro. La sintomatologia si manifestava a partire dai primi giorni di vita con tappo cloacale ed enterite.

I gruppi coinvolti presentavano mortalità improvvisa con enterite catarrale a carico di duodeno ed ileo. Gli esami virologici venivano allestiti a partire da omogenati di cuore, fegato ed intestino; gli omogenati venivano inoculati su uova embrionate di pollo SPF e colture primarie di fegato di embrione di pollo; i risultati degli esami virologici mettevano sistematicamente in evidenza la presenza di reovirus. Anche la microscopia elettronica, eseguita direttamente sul contenuto intestinale, rivelava la presenza di reovirus. Trascorsi circa dieci giorni dall'inizio dei segni clinici la sindrome si aggravava ulteriormente con fenomeni di mancato accrescimento, disoressia, e diarrea acquosa (con conseguente lettiera bagnata). Questa situazione in certi gruppi perdurava fino alla fine del ciclo produttivo, causando un'elevata formazione di scarti e alterando gli indici di conversione dell'alimento.

Le lesioni anatomo-patologiche consistevano in grave enterite con contenuto fluido, chiazze ovalari-emorragiche lungo la parete del duodeno e di gran parte dell'ileo, cloacite, presenza di mangime indigerito nell'intestino, carni molli e scure.

Le indagini di laboratorio condotte sui mangimi mettevano in evidenza, nei casi più gravi, la presenza di perossidi e delle seguenti micotossine: fumonisine (nell'ordine di 20-25 ppm) e tossina T2 (20-40 ppb).

In un caso molto grave, osservato a circa 40 giorni di età, è stato condotto un profilo ematochimico del gruppo colpito. A tale scopo sono stati saggiati 30 campioni di plasma e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da soggetti sani di pari età, sesso e linea genetica (Tabella 1).

Tabella 1: Profilo emato-chimico in soggetti con sindrome enterica
Table 1: Haematological parameters in chicks with enteric syndrome

Analita	Unità di misura	Media gruppo colpito	Differenza	Media controllo
Protidemia totale	g/L	55,00	30%	38,50
Albumina	g/L	20,53	24%	15,67
Globuline	g/L	34,47	39%	21,00
Glucosio	mmol/L	17,72	7%	16,48
Colesterolo	mmol/L	3,86	18%	3,16
Beta-idrossibutirato	mmol/L	0,56		
Bilirubina totale	micromol/L	2,57	-8%	2,77
Alanina transaminasi	IU/L	5,80	25%	4,33
Aspartato transaminasi	IU/L	258,73	23%	199,67
Fosfatasi alcalina	IU/L			
Gamma-glutamilttransferasi	IU/L	70,53	54%	32,25
Creatinina	micromol/L	47,07	27%	27,00
Creatin-chinasi	IU/L	3140,00	6%	2953,00
Lattato deidrogenasi	IU/L	1574,00	22%	1234,00
Calcio	mmol/L	2,17	-3%	2,24
Fosforo(po4)	mmol/L	1,74	-4%	1,81
Magnesio	mmol/L	1,08	10%	0,97
Sodio	mmol/L	149,00	-4%	155,25
Potassio	mmol/L	5,84	8%	5,38
Cloro	mmol/L	120,00	-2%	122,50
Amilasi	U/L	884,00	2%	864,00
Ac. Grassi non esterificati	mmol/L	0,97	-52%	1,47

Come si può notare esistono differenze significative dei seguenti valori: protidemia totale, albumina, globuline, transaminasi, G.G.T., creatinina ed acidi grassi non esterificati. L'analisi del mangime ha messo in evidenza la presenza di perossidi, fumonisine (25 ppm) e T2 (15 ppb). Si può pertanto avvalorare la seguente ipotesi eziologica: l'infezione da reovirus ha avuto un ruolo primario nell'instaurarsi della forma enterica. Fattori manageriali e alimentari hanno contribuito al perdurare e all'aggravarsi della sindrome da malassorbimento e del grave dismetabolismo osservato. (3).

PROBLEMI CONNESSI ALLE MICOTOSSICOSI

L'esclusione delle farine di origine animale dall'alimentazione zootecnica e il conseguente incremento dell'uso di materie prime di origine vegetale hanno senz'altro contribuito all'aumento dell'incidenza delle patologie collegate alla presenza di micotossine nel mangime. Le micotossine sono metaboliti fungini di tipo secondario. La presenza o meno di questi composti nel mangime finito dipende da molti fattori fra i quali vanno menzionati:

- le condizioni climatiche;
- il tipo di materia prima utilizzata;
- il tipo di muffe e/o di tossine presenti;
- danni meccanici causati da insetti;
- l'uso di fungicidi;
- le condizioni di conservazione;
- eventuali trattamenti del mangime.

Fra le micotossine che maggiormente interessano le nostre realtà produttive si ricordano:

- **Aflatossine:** sono estremamente tossiche (soprattutto a livello epatico). Le materie prime maggiormente a rischio di contaminazione sono: grano, riso, semi di cotone e arachide.
- **Ocratossine:** hanno una spiccata attività nefrotossica. Sono frequenti nelle derrate coltivate nei climi temperati. L'Ocratossina di tipo A è inoltre altamente cancerogena.
- **Tricoteceni (tossina T2 e Deossivalenolo o DON):** vengono rilevate in tutti i tipi di cereali. Sono dermatossiche.
- **Fumonisine:** hanno una distribuzione ubiquitaria. La più tossica è la fumonisin B₁.
- **Zearalenone:** è dotata di attività estrogenica.

ANALISI DI LABORATORIO DELLE PRINCIPALI MICOTOSSINE

La maggior parte delle micotossine può essere rilevata e quantificata mediante la tecnica della cromatografia liquida su strato sottile (TLC). Un sistema rapido ed economico di monitoraggio è rappresentato dalla metodica ELISA, anche se i risultati quantitativi devono essere interpretati con estrema cautela.

Approccio ideale sul mangime per la determinazione delle contaminazioni fungine o da micotossine

- a) tecnica del conteggio di muffe e lieviti espressa in ufc/g.
- b) determinazione delle micotossine in ELISA.
- c) Conferma dei dati ottenuti in ELISA con la tecnica TLC.

Tabella 2: Determinazione micotossine in mangimi mediante tecnica ELISA (anno 2002 – Sezione IZSLER di Forlì)

Table 2: *Micotoxines detection by ELISA method at the IZSLER Forlì during 2002*

FUMONISINE TOTALI (mg/Kg)		Dal 03/01/2002 al 29/07/2002	
N. di determinazioni	% di campioni positivi	Valore max riscontrato	Valore min riscontrato
146	73	40	0,2
AFLATOSSINE TOTALI (B1,B2,G1,G2) (µg/Kg)		Dal 03/02/2002 al 10/07/2002	
N. di determinazioni	% di campioni positivi	Valore max riscontrato	Valore min riscontrato
73	58	21	2
OCRATOSSINA A (µg/Kg)		Dal 03/01/2002 al 06/06/2002	
N. di determinazioni	% di campioni positivi	Valore max riscontrato	Valore min riscontrato
60	16,6	8	0,14
TOSSINA T2 (mg/Kg)		Dal 3/01/2002 al 29/07/2002	
N. di determinazioni	% di campioni positivi	Valore max riscontrato	Valore min riscontrato
81	100	0,039	0,007
ZEARALENONE (µg/Kg)		Dal 03/01/2002 al 24/05/2002	
N. di determinazioni	% di campioni positivi	Valore max riscontrato	Valore min riscontrato
60	31,6	9	0,3

Casi clinici riferibili a mitossicosi

1. **Fusariosi** in broilers, tacchini, galline ovaiole.
2. **Gastriti erosive nelle galline ovaiole.** Diversi sono gli episodi osservati e tutti hanno la caratteristica di comparire improvvisamente e di scomparire altrettanto rapidamente nell'arco di circa 7-10 giorni. Le galline colpite da ulcere gastriche in prossimità del piloro vengono a morte con aspetto fortemente anemico accompagnato in certi casi da reflusso esofageo di sangue digerito. E' una patologia descritta nei paesi dove si fa largo uso di farine di pesce contaminata da gizzerosina, una ammina tossica biogena che si forma nella farina di pesce scaldata troppo durante l'essiccazione. Essa ha un'azione simile all'istamina e stimola la secrezione di succhi gastrici nella mucosa del proventriglio causando erosioni a carico della mucosa del ventriglio. I gruppi colpiti presentano mortalità e calo di deposizione. Non è semplice individuare la causa scatenante ed il meccanismo che la determina nella nostra realtà zootecnica. Dal momento che non esistono tests disponibili per valutare la presenza della gizzerosina è stata considerata l'idea di ricercare l'istamina dagli stomaci e dal loro contenuto in tutti i casi riscontrati nell'ultimo anno. Sono stati esaminati in HPLC 38 campioni provenienti da altrettanti allevamenti-problema. In 15 casi è stata riscontrata la presenza di istamina con valori compresi fra 13 mg/Kg e 87,5 mg/Kg. Da questo si può dedurre che sostanze come l'istamina o simili possono essere coinvolte nel meccanismo patogenetico delle gastriti con melena.
3. **Gastriti emorragiche** in broiler e ovaiole con emorragie ed edema della mucosa e della sottomucosa gastrica. Nel meccanismo eziopatogenetico possono essere determinanti micotossine come le fumonisine ed i tricoteceni. Nelle ovaiole l'azione combinata di queste con sostanze acidificanti addizionate all'alimento sembra aggravare il quadro clinico e anatomo-patologico.
4. **Necrosi della cresta e dei bargigli:** sono stati osservati quattro gravi episodi caratterizzati da gravi lesioni ischemiche della cresta e dei bargigli in galline ovaiole (due gruppi allevati in batteria e due allevati a terra) di età compresa fra 30 e 40 settimane. In alcuni casi si osservava anche la necrosi della punta della lingua. L'indice di morbilità raggiungeva in alcuni casi valori attorno al 70-80% e i segni clinici erano caratterizzati da disoressia, abbattimento del sensorio, calo drastico della ovodeposizione. Tutti i gruppi venivano colpiti nel mese di novembre 2001. Molto lentamente (circa due mesi) i gruppi colpiti riprendevano il ritmo produttivo normale. La sintomatologia e le lesioni erano ascrivibili a ergotismo. Si tratta di una sindrome causata dallo sclerozidio di funghi del genere *Claviceps* spp. che attaccano vari tipi di cereali fra cui il grano ed il mais. Lo sclerozidio può contenere quantità variabili di alcaloidi dell'ergot. L'ergot causa vasocostrizione e a dosi ripetute danneggia gravemente l'endotelio vascolare. Questo porta ad una riduzione del flusso ematico con conseguente necrosi delle estremità. Nelle galline in deposizione l'ergotismo si presenta con calo del consumo alimentare e dell'ovodeposizione e con lesioni caratteristiche alla cresta ed ai bargigli che tendono ad atrofizzarsi completamente. (5).

ENTERITE NECROTICA

E' sostenuta da *Clostridium perfringens* e colpisce polli, tacchini, anatre. E' una malattia multifattoriale influenzata dai seguenti fattori:

- virus immunodepressivi: anemia infettiva del pollo e bursite infettiva;
- variazione nella composizione della dieta;
- eliminazione dei promotori di crescita;
- coccidiosi;
- rimozione degli ionofori;
- qualità della lettiera;
- vuoto sanitario troppo breve;
- linea genetica.

L'incidenza dell'enterite necrotica è aumentata enormemente negli ultimi due anni nel broiler, nella gallina ovaioia e nel tacchino.

I casi clinici variano da episodi acuti con mortalità improvvisa a episodi di patologia strisciante con arruffamento del piumaggio, depressione e disoressia. Nel broiler si verifica per lo più fra i 18 e 20 giorni di età. La crescita è compromessa e si osserva una notevole disparità di sviluppo nel gruppo colpito. Nella gallina ovaioia le forme subcliniche di duodenite e ileite da clostridi sono causa di una flessione della produzione e di un deprezzamento del colore e della consistenza del guscio delle uova deposte. Nella sua forma classica l'intestino appare molto disteso e meteorico, mentre la mucosa è assottigliata e ricoperta da una pseudomembrana necrotico-emorragica giallo-verdastra. In alcuni casi è colpito anche il fegato che appare aumentato di volume e ricoperto da lesioni necrotiche giallo-verdastre. (4).

Bibliografia

1. Bigot K., Tesseraud S., Taouis M., Picard M., (2001) "Alimentation néonatale et développement précoce du poulet de chair". INRA Prod. Anim., 14, 219-237.
2. Calini F. (2002) comunicazione personale.
3. Dhawale A. (2002) "Malabsorption syndrome in young pullets". World Poultry, 18, 32-34.
4. Ficken M.D., Wages D.P. (1997) "Necrotic enteritis" in: B.W.Calnek: Diseases of Poultry, 10th Edition. Iowa State University Press. Ames, Iowa, 261-264.
5. Hoerr F.J. (1997) "Mycotoxicosis" in: B.W.Calnek: Diseases of Poultry, 10th Edition. Iowa State University Press. Ames, Iowa, 951-979.
6. Leeson S. (2001) "Il ruolo dell'alimentazione nel mantenimento di un prodotto avicolo di qualità". Zootecnica International, 4, 42-43.

COMUNICAZIONE 1

USO DI LATTOBACILLI COME PROBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO DEL GALLO E DELLA GALLINA RIPRODUTTORI PESANTI

M. SEGA¹, M.C. CASTELLO²

¹Agricola Berica srl – Monselice (PADOVA)

²Libero Professionista – Italia Pegasus Institute - Via Libia, 35 13100 VERCELLI mcastello@pagnaghe.it

Parole chiave: Lattobacilli, probiotici, riproduttori pesanti

Use of *Lactobacillus* spp. as probiotic in broiler breeder flocks.

Key words: *Lactobacillus* spp., probiotics, broiler breeders

Summary: In this work Authors had tested in field the utility of the use of *Lactobacillus* spp. in a broilers breeders flock. Particular attention has been placed to the change of egg's quality in the hatchery, mainly in the bacterial contamination of the shell and relative hatchery contamination.

Correspondence: Marco Segà c/o Ag. Berica - Via Rovigana, 47 - 35043 Monselice (PD)

Introduzione

La microflora gastrointestinale di animali adulti e sani varia enormemente in funzione di numerosi e complesse interazioni in grado di inibire la colonizzazione di patogeni invasivi.

Squilibri in tale ecosistema riducono l'effetto di protezione della microflora autoctona fornendo una valida opportunità ai microrganismi patogeni enterici di colonizzare l'intestino.

Questa situazione si può facilmente osservare negli animali durante i periodi di stress o in seguito a somministrazione di antibiotici.

L'esclusione competitiva rappresenta quell'intervento di profilassi indiretta operato da microrganismi probiotici e da sostanze definite prebiotiche al fine di migliorare l'equilibrio microbico intestinale.

Con la seguente sperimentazione si intende verificare come la somministrazione tramite l'acqua di bevanda di una flora costituita da cellule vive di *Lactobacillus acidophilus* (XENOLAC CSL) specifiche per specie avicole, possa influire sulle performance produttive di un gruppo di galline e galli riproduttori di linee pesanti. In particolare si intende porre l'attenzione su precisi parametri quali:

- mortalità delle galline
- percentuale di deposizione
- totale carica microbica totale del guscio
- eventuale presenza di salmonelle.

Materiali e metodi

La sperimentazione, della durata complessiva di cinque mesi, da gennaio a maggio 2001, è stata effettuata presso un allevamento di galline e galli riproduttori pesanti Cobb 500 dell'età iniziale di 28 settimane. Per tale prova gli animali sono stati distinti in due gruppi omogenei, A e B, ciascuno dei quali accasato in due capannoni, ciascuno di 900 mq, aventi le medesime caratteristiche strutturali e di esposizione, con nidi automatici SKA, ventilazione naturale, illuminazione naturale integrata da lampade al neon. Il gruppo A è stato trattato mensilmente con lattobacilli e il B è stato utilizzato come controllo.

Sono stati rilevati i dati produttivi, la mortalità, e alcuni parametri microbiologici delle uova. Per l'esecuzione della prova, ai soggetti accasati nei capannoni 1 (5091 femmine e 448 maschi) e 2 (5076 femmine e 461 maschi), ovvero il gruppo A, era somministrata, con cadenza mensile e per quattro giorni consecutivi, una flora costituita da lattobacilli selezionati da specie

avicole (XENOLAC CSL), nella misura di 1 grammo (pari a 10^{10} UFC di *L. acidophilus*) ogni 100 capi, avendo l'accortezza di sciogliere tale prodotto nell'acqua che gli animali consumavano nell'arco di 5-6 ore.

Gli animali accasati nei capannoni 3 (5066 femmine e 471 maschi) e 4 (5084 femmine e 471 maschi), strutture simmetriche per collocazione, servivano da controllo e venivano denominati gruppo B.

Il mangime composto integrato era somministrato mediante catene seguendo la curva di razionamento consigliata dalla casa di selezione genetica Cobb.

L'acqua di bevanda era somministrata per mezzo di abbeveratoi automatici a goccia (nipples).

La luce era fornita per 17 ore giornaliere, dalle 4.00 alle 21.00, con una intensità di 100 Lux.

Quotidianamente, sulle tabelle dei capannoni, erano segnate la mortalità delle galline e la deposizione totale.

Ogni circa tre settimane era inoltre effettuata, presso l'Istituto Zooprofilattico di Padova, un'analisi batteriologica su di un campione costituito da 50 uova per capannone al fine di valutare la carica microbica mesofila totale (CMT) del guscio e l'eventuale presenza di salmonelle interne ed esterne all'uovo.

Le analisi quantitative sono state condotte secondo le metodiche previste dalla normativa ISO 4833/91, utilizzando terreni agarizzati PCA, mentre le qualitative sono state condotte in base alle procedure previste dalla normativa ISO 65/79 prelevando, relativamente all'interno dell'uovo, un campione di 50 grammi.

Durante il periodo di osservazione non è stato somministrato alcun trattamento antibiotico.

Risultati

Nella tabella n°1 sono riportati i dati relativi alla percentuale di deposizione mensile delle uova durante il periodo di sperimentazione, ovvero da gennaio a maggio, raffrontando la produzione del gruppo A con quella del gruppo di controllo B.

In entrambi i casi gli animali hanno seguito il loro naturale andamento produttivo anche se l'istogramma del gruppo A, a partire dal mese di febbraio si è discostata in modo significativo registrando, al termine della prova, un incremento medio produttivo pari all'1,07%.

Tabella 1. % di produzione**Table 1:** % of production

	Trattati	Controllo
Gennaio	74.31	74.35
Febbraio	77.61	77.59
Marzo	73.35	72.05
Aprile	67.58	65.77
Maggio	62.99	60.72

Come da tabella n°2, raffrontando i dati relativi alla mortalità delle galline, particolarmente interessanti per le correlazioni che possono esserci tra patologie intestinali e ovariche, si è visto come essa sia rimasta ampiamente nella norma per tutti e due i gruppi sebbene leggermente più elevata in quello non trattato per un valore medio pari allo 0,08%.

Gli esami microbiologici effettuati ogni 3 settimane circa, non hanno mai rivelato presenza di salmonelle per nessun campione di uova analizzato.

Tabella 2: % di mortalità**Table 2:** % of mortality

	Trattati	Controllo
Gennaio	1.10	1.14
Febbraio	0.85	0.97
Marzo	0.93	0.91
Aprile	0.62	0.87
Maggio	0.86	0.86

L'analisi della carica microbica mesofila totale per cm², come specificato dalla tabella n°3 ha indicato fin da subito, nel gruppo trattato valori costantemente più bassi e quindi un maggiore livello igienico sanitario. È altresì importante rilevare la carica eccessivamente elevata relativa al gruppo B nel mese di gennaio, probabilmente dovuto ad inquinamento durante il prelievo.

Tabella 3: c.m.t. ufc/cm²**Table 3:** t.m.c cfu/cm²

	Trattati	Controllo
Gennaio	7150	64750
Febbraio	535	2140
Marzo	1047	1845
Aprile	230	450
Maggio	310	400

Una ipotesi che può essere formulata per spiegare tali risultati è quella della positiva azione della flora lattica

che indurrebbe, a livello intestinale, il crearsi di un ambiente micro-ecologico più favorevole per l'animale, con l'instaurarsi non solo di una maggiore resistenza alla flora patogena, ma anche di un miglioramento dei processi digestivi e quindi dell'assorbimento dei principi nutritivi introdotti con l'alimentazione.

Discussione

La sperimentazione condotta sulle galline e galli riproduttori pesanti ha dimostrato che il trattamento orale periodico con lattobacilli (*L. acidophilus*) selezionati da specie avicole (XENOLAC CSL), mantenendo stabile l'equilibrio microbico dell'ecosistema gastrointestinale, ottimizza l'assorbimento delle sostanze nutritive, a tutto vantaggio del benessere e della produzione dell'ospite.

In particolare l'effetto benefico si è manifestato nell'incremento percentuale della deposizione e nel miglioramento delle qualità igieniche delle uova.

Questi risultati comportano indubbi vantaggi sia di tipo economico che sanitario, contribuendo al raggiungimento di quegli standard qualitativi che il consumatore richiede e che oramai nessun produttore può trascurare se vuole continuare ad essere competitivo sul mercato.

Bibliografia

- Bailey J.S.(1993). Control of Salmonella and Campylobacter in poultry production. A summary of work at Russel Research Center. Poultry Sci., 72,1169.
- Giardini e coll. (2001), a. Batteri lattici e flora gastroenterica. Rivista di avicoltura, 4, 8.
- Giardini e coll. (2001), b. Esclusione competitiva e batteri lattici. Rivista di avicoltura, 5, 40.
- Giardini e coll. (2001), c. Batteri lattici, un mondo da conoscere. Rivista di avicoltura, 2, 12.
- Giardini e coll. (2001), d. Tassonomia e habitat dei batteri lattici. Rivista di avicoltura, 5, 40.
- Giardini e coll. (2001), e. La probiotica con i batteri lattici. Rivista di avicoltura, 6, 14.
- Guillot J.F., Ruckebusch Y. (1994). Microflore digestive des animaux. In: (De Roissart H. e Luquet F.M.) "Bactéries lactiques", vol.II, Loriga, Paris, 343.
- Rantala M., Nurmi E. (1973). Prevention of the growth of Salmonella infantis in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. Br. Poult. Sci., 14, 627.
- Sarra P.G., Badini C. (1998). Performance zootecniche di pulcini e trattamenti probiotici. Rivista di Avicoltura, 3, 41.
- Tannock G.W. (1994). The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. In: (Gibson A.W.) "Human health: the contribution of microorganisms". Springer-Verlag, London, 1.

COMUNICAZIONE 2

TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI GALLINE OVAIOLE DELL'ITALIA MERIDIONALE

G. DI MODUGNO¹, A. PARISI², A. CAMARDA¹, F. CAPUANO³, D. DI MODUGNO¹

¹Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Sezione di patologia Aviaria, Università degli Studi di Bari

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Foggia

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

Parole chiave: *Campylobacter jejuni*, tossinfezioni alimentari, tipizzazione genetica, PCR-RFLP

Typing of *Campylobacter jejuni* isolated from laying hens breeding in South Italy

Key words: *Campylobacter jejuni*, food poisoning, molecular typing, PCR-RFLP

Summary: *Campylobacter jejuni* isolated from cloacal swabs of laying hens in three intensive breeding of South Italy have been biotyped according Lior (1984) and genotyped with *flaA* PCR-RFLP (Nachamkin, *et al.* 1993). The average rate of isolation of *C. jejuni* was 34,37%, in farm A, and 33,34% and 64,26% respectively in the breeding B and C. The biotyping showed in all the breeding the contemporaneous presence of biotypes 1 and 2. The first one prevailed in the farm A (55,55%), the second in the farm B and C (53,84% and 57,14% respectively). The biotype 1 has a particular epidemiological importance because associated with human enteritis. The genotyping revealed a great discriminating power of the biotyping. The PCR-RFLP showed 9 different profiles *HinfI/DdeI*, 3 in the breeding A (1/1, 2/3, 2/2) and B (1/4, 3/5, 2/6) and 4 (1/4, 3/7, 1/8, 1/9) in the farm C. Nevertheless in every one flock it seems prevailing a single genetic profile.

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.uniba.it

Introduzione

Campylobacter (C.) jejuni viene riconosciuto tra gli agenti più frequentemente coinvolti come causa di tossinfezioni alimentari nell'uomo (7). Il pollame è considerato il serbatoio principale del germe, le cui caratteristiche biologiche e genetiche sono ancora oggi scarsamente conosciute. Si è ritenuto, pertanto, di effettuare ricerche sulla tipizzazione di ceppi *C. jejuni* isolati in allevamenti intensivi di galline ovaiole. I germi sono stati biotipizzati secondo la metodica di Lior (3) e sottoposti a PCR-RFLP della flagellina A.

Materiali e metodi

Campionamento ed isolamento dei *C. jejuni*. Le ricerche sono state condotte in 3 allevamenti intensivi di galline ovaiole per la produzione di uova da consumo situate rispettivamente in provincia di Bari (Aziende A e B) ed in provincia di Salerno (Azienda C). Gli animali erano stati introdotti in azienda a 120 giorni di vita, e provenivano, quelli dell'azienda A da Asti, quelli dell'azienda B da Crotone e quelli dell'azienda C da Forlì. Il campionamento è stato effettuato dalle galline ovaiole in deposizione scelte a *random* nel capannone. In totale sono stati eseguiti n.70 tamponi cloacali: n.32 nell'azienda A, n. 24 nell'azienda B e n. 14 nell'azienda C. Per la raccolta dei campioni, la coltivazione, l'isolamento e l'identificazione del *C. jejuni* sono state utilizzate le metodiche descritte da Di Modugno *et al* (3)

Tipizzazione biologica di *C. jejuni* secondo Lior

Sono stati sottoposti a tipizzazione biologica secondo Lior (4) n.28 ceppi di *C. jejuni* isolati dalle Aziende A (8 ceppi isolati da sette animali diversi), B (13 ceppi isolati da sei animali diversi), C (7 ceppi isolati da sei animali diversi).

Tipizzazione genetica di *C. jejuni*

I ceppi isolati sono stati sottoposti a tipizzazione mediante PCR – RFLP della flagellina A secondo la metodica descritta da Nachamkin *et al* (7). Sono stati impiegati i seguenti primers:

A1: 5' -GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC – 3'

A2: 5' –CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG – 3'

La Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) è stata attuata effettuando una digestione separata con gli enzimi di restrizione *HinfI* e *DdeI* (10 UI) degli amplificati, separati successivamente mediante elettroforesi in gel di agarosio (2% p/v di Nusieve, più 0,65% di agarosio) a 90 V per 90 minuti.

A ciascun profilo RFLP è stato assegnato un valore numerico sulla base dei pattern di restrizione ottenuti rispettivamente con gli enzimi *HinfI* e *DdeI* e in accordo a quanto descritto da Ayling *et al.* (1).

Risultati

Campylobacter jejuni è stato isolato da tutti e tre gli allevamenti sottoposti a campionamento.

Nell'allevamento A la positività media dei tamponi era del 34,37%, in quello B del 33,34% e nell'allevamento C del 64,26%. La biotipizzazione degli stipiti batterici isolati consentiva l'individuazione dei soli biotipi 1 e 2 presenti in tutti e tre gli allevamenti. I biotipi 3 e 4 non sono mai stati riscontrati. Il biotipo 1 costituiva mediamente il 48,27% degli stipiti; il biotipo 2 rappresentava invece il restante 51,72%. Quest'ultimo, inoltre, prevaleva nelle aziende B e C dove raggiungeva percentuali del 53,84% e 57,14%. Il tipo 1 invece era maggiormente presente nell'allevamento A (55,55%). La PCR degli stipiti isolati consentiva di individuare, in tutti i ceppi testati, la banda attesa di precipitazione di circa 1700 pb tipica del *Campylobacter jejuni*. La successiva restrizione dell'amplificato con gli enzimi *HinfI* e *DdeI* consentiva di individuare ben 9 differenti profili (tabella 1), distribuiti: 3 nell'azienda A (profilo 1/1, 2/2, 2/3), 3 nell'azienda B (1/4, 3/5, 2/6) e 4 (1/4, 3/7, 1/8, 1/9) in quella C. Il confronto tra biotipizzazione e *flaA* PCR-RFLP evidenziava la netta mancanza di corrispondenza tra i profili ottenuti con le due metodiche. Non è stato infatti possibile attribuire in maniera univoca a ciascun biotipo, uno o più profili genetici.

Discussione

Le ricerche effettuate confermano la presenza costante e consistente del *Campylobacter jejuni* negli allevamenti avicoli intensivi. Le percentuali di

isolamento del germe, risultate mediamente del 40%, sono analoghe a quelle riscontrate da Di Modugno *et al.* (3) i quali, unitamente a Lior (4) ribadivano con la biotipizzazione la prevalenza dell'isolamento dei biotipi 1 e 2. Il biotipo 1 assumerebbe particolare rilievo epidemiologico in quanto più frequentemente associato a pazienti umani affetti da enterite (8). Dalle presenti ricerche si evidenzia, tuttavia, che una più efficace differenziazione dei ceppi di *C. jejuni* isolati non possa essere ottenuta con la biotipizzazione, ma con la tipizzazione genetica utilizzando le due endonucleasi (*Hinf1* e *Dde1*) sullo stesso amplificato. Tale tipizzazione genetica ha consentito di individuare più tipi genetici all'interno di ciascun biotipo e di ciascun allevamento (tab. 1) che non si ripetono se non occasionalmente negli altri due allevamenti presi in esame. Infatti solo il profilo 1,4 è presente contemporaneamente in due aziende. In ciascun gruppo di animali apparirebbe prevalente un singolo profilo genetico (*Hinf1/Dde1*). Infatti nell'allevamento A prevale il profilo 1,1 (*Hinf1/Dde1*), riscontrato in 5 animali su 7 esaminati (71,42%), nell'allevamento B il profilo 1,4 evidenziato in 4 soggetti su 6 (66,67%) e nell'allevamento C il profilo 3,7 in 2 animali su 6 (33,33%).

Dai risultati ottenuti sembrerebbe che la diversa provenienza delle pollastre (Asti, Crotone, Forlì) e l'ubicazione degli allevamenti consentirebbe la colonizzazione di popolazioni di *Campylobacter jejuni* tipiche di ogni gruppo considerato. Resta da chiarire il significato epidemiologico di queste osservazioni. Non è, infatti, ancora noto se a ciascuno stipite di *C. jejuni* sia attribuibile una specifica attività patogena. Considerato, inoltre, che uno stesso tipo genetico, diverso da quelli riscontrati nell'intestino, può essere evidenziato contemporaneamente nell'ovidutto e sulle uova di uno stesso gruppo di ovaiole (2, 3), è

necessario approfondire se ad un dato genotipo è possibile attribuire uno specifico tropismo d'organo. Utili conferme possono derivare dalla standardizzazione ed armonizzazione delle metodiche utilizzate nei vari laboratori per rendere più facilmente confrontabili i risultati ottenuti.

Bibliografia

1. Ayling, R.D., Woodward, M.J., Evans, S. and Newell, D.G. (1996). "Restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry *Campylobacters* for epidemiological investigations". Res. in Vet. Sci. 60:168-162.
2. Cox N.A., Stern N.J., Hiett K.L. and Berrang M.E. (1999). "*Campylobacter* passage from hen to offspring through the eggs". PROC. of 34th National Meeting on Poultry Health Processing. 20-22 Oct 1999. Ocean City Maryland pag. 6-7.
3. Di Modugno G., Nasti R., Camarda A., Circella E., (2000). Tipizzazione ed antibiotico resistenza di *Campylobacter jejuni* isolati dal contenuto intestinale, ovidutto e guscio di uova da consumo. Sel. Vet. 8-9., 741-750.
4. Lior H. (1984). New extend biotyping scheme for *C. jejuni*, *C. coli* and "*C. lariidis*". J. Clin. Microbiol. 20,1065-1073.
5. Lior, H.D.L. Woodward, J.A. Edgar, L. J. Laroche, and P. Gill. (1982). Serotyping of *C. jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. J. Clin. Microbiol. 15:761-768.
6. Nachamkin, I., Bohachick, K. and Patton, C.M. (1993). "Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis". J. Clin. Microbiol. 31:1531-1536.
7. Richardson J.F., Frost J.A., Kramer J.M., Thwaites R.T., Bolton F.J., Wareing D.R.A., Gordon J.A. (2001). "Coinfection with *Campylobacter* species: an epidemiological problem?" J. Appl. microbiol. , 91-206-211
8. Varoli O., Montella M.T., La Placa M. jr (1991). Observation made on strains of *Campylobacter* spp. isolated in 1989 in Northern Italy. Microbiology 14,31-35.

Tabella 1: Biotipi (Lior, 1984) e profili di restrizione *Hinf1/Dde1* di *C. jejuni* in 3 allevamenti di galline ovaiole.

Table 1: Biotypes (Lior, 1984) and *Hinf1/Dde1* profiles of *C. jejuni* isolated from laying hens of 3 three intensive breeding

Allev.	N° stipiti	Profili genetici <i>Hinf1/Dde1</i>		% di frequenza del profilo (<i>Hinf1/Dde1</i>)	Biotipo	
		N°stipiti	Profilo		1	2
A	8*	5	1,1	62,5	4/5	1/5
		1	2,3	12,5	1/1	0/1
		2	2,2	25	0/2	2/2
B	6	4	1,4	66,67	2/4	2/4
		1	3,5	16,66	1/1	0/1
		1	2,6	16,66	0/1	1/1
C	6	2	1,4	33,33	1/2	1/2
		2	3,7	33,33	1/2	1/2
		1	1,8	16,66	0/1	1/1
		1	1,9	16,66	0/1	1

*due ceppi isolati da uno stesso animale

COMUNICAZIONE 3

PRIMI RISULTATI SULLA PRESENZA DI ENTEROPATOGENI IN TACCHINI COMMERCIALI

T. RAMPIN, Z. BERNARDI, G. SIRONI, G. MANAROLLA, C. NATALI, G. GRILLI

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

Parole chiave: tacchino, virus enterici, coronavirus, adenovirus, salmonelle

Presence of enteropathogens in commercial turkeys – preliminary report

Key words: turkey, enteric viruses, coronavirus, adenovirus, salmonellae

Summary: It is evaluated by negative staining electron microscopy the presence of enteric viruses in commercial turkey flocks with or without enteric signs. The role of coronaviruses found in intestinal content of symptomatic flocks is discussed. The histological finding of HEV in a normal flock and recurrent isolations of salmonellae not related to enteric signs are reported.

Correspondence: Tiziana Rampin - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano – Via Celoria 10 – 20133 Milano. Email tiziana.rampin@unimi.it

Introduzione

Le forme enteriche negli allevamenti avicoli industriali sono uno dei problemi più sentiti per il riflesso sulla produzione ed inoltre soprattutto per il tacchino appaiono di difficile caratterizzazione eziologica. Proprio in tacchini commerciali si notano da qualche anno forme enteriche a partire da 3-4 fino a 7-8 settimane di vita, che solo parzialmente si riescono a controllare con terapia e che si trascinano nel gruppo con lieve aumento di mortalità e di indice di conversione. I tacchini manifestano inizialmente alterazioni del comportamento: pigolano insistentemente, mostrano piumaggio arruffato e segni di sofferenza. Si ammassano anche a piccoli gruppi, pur essendo la temperatura perfettamente adeguata, talvolta anche aumentata per un tentativo dell'allevatore di favorire una ripresa degli animali. Si notano segni di nervosismo come la tendenza a beccare anche a morte gli altri animali e un fenomeno di continuo movimento di parte dei soggetti. Le condizioni delle lettiere peggiorano nettamente a causa delle deiezioni particolarmente acquose.

Scartata l'ipotesi di un coinvolgimento dei coccidi, in base a indagini precedenti (1), come pure dei flagellati risultati marginali e sporadici a livello enterico, si è pensato di valutare il ruolo di altri patogeni enterici nelle forme morbose riscontrate in campo. Sono stati presi in considerazione a questo scopo virus enterotropi, di cui esistono numerose segnalazioni nel tacchinotto (2), senza trascurare tra i batteri enteropatogeni le salmonelle. Inoltre dagli animali sottoposti a prelievo sono stati allestiti esami istologici di vari tratti dell'apparato digerente e dei principali visceri. Parallelamente per valutare la funzionalità epatica e pancreatica sono stati eseguiti esami ematochimici dei quali non si riferisce in questa comunicazione.

Materiali e metodi

Nel corso delle presenti indagini sono state seguite 4 partite commerciali in un periodo di tempo compreso tra l'Aprile 2001 e il Febbraio 2002. Inoltre nello stesso periodo di tempo è stato esaminato materiale prelevato da 5 partite di tacchini all'inizio della sintomatologia enterica. I prelievi comportavano generalmente il sacrificio di 5/6 tacchinotti all'incirca con cadenza settimanale. I tacchini, scelti a caso nel gruppo, venivano sottoposti a prelievo di sangue per le indagini ematochimiche, sacrificati per dislocazione

delle vertebre cervicali e sottoposti a necropsopia. Si prelevava individualmente il materiale per la ricerca dei virus enterici, per l'esame batteriologico e istologico. Quest'ultimo veniva fatto solo da 2 dei tacchini sacrificati.

Dati riguardanti le partite controllate. **C 1** Gruppo di 15.000 tacchinotti maschi nati il 20/03/01. I prelievi sono stati eseguiti a 1, 4, 9, 13, 17 e 23 giorni di vita per il controllo dei virus enterici e l'esame istologico del digerente. L'esame batteriologico per la ricerca di salmonelle è stato fatto a 4, 9, 13 e 17 giorni di vita. **C 2** Gruppo di 10.500 tacchinotti maschi nati il 29/08/01. I prelievi sono stati eseguiti a 1, 3, 7, 10, 15, 21, 28 e 35 giorni di vita. **C 3** Gruppo di 20.000 tacchinotti maschi nati il 29/08/01. I prelievi sono stati eseguiti a 1, 3, 7, 10, 15, 22, 28 e 35 giorni di vita. **C 4** Gruppo di 6.000 tacchinotti femmine nate il 10/12/01. I prelievi sono stati eseguiti a 1, 5, 8, 11, 18, 22, 29 e 36, 50 e 64 giorni di vita.

Gruppi sintomatici Con le stesse modalità sono stati inoltre controllati tacchinotti di 5 partite diverse subito dopo la comparsa di sintomatologia enterica:

S 1: tacchinotti femmine di 9 giorni; S 2: tacchinotti maschi di 21 giorni; S 3: tacchinotti femmine di 26 giorni; S 4: tacchinotti maschi di 27 giorni; S 5: tacchinotti maschi di 24 giorni.

Le condizioni di allevamento erano sostanzialmente le stesse; l'alimentazione era quella in uso per tutti i gruppi commerciali, solo nella partita C 4 non veniva utilizzata la farina di pesce, somministrando una dieta esclusivamente vegetale. I programmi vaccinali prevedevano una vaccinazione spray per TRT in incubatoio, una vaccinazione nell'acqua a 6/7 gg di vita contro la Pseudopeste, una vaccinazione con vaccino spento a 22/23 gg di vita contro l'Enterite Emorragica. Alcuni dei gruppi erano situati nella zona in cui era obbligatoria la vaccinazione nei confronti dell'Influenza Aviaria e venivano vaccinati a 1, 21 e 42 giorni di vita.

Esami istologici. Subito dopo il sacrificio venivano raccolti campioni di stomaco ghiandolare e muscolare, ansa duodenale e pancreas, ileo e ciechi, fegato, milza, borsa di Fabrizio e timo che, dopo fissazione in formalina al 10% e inclusione in paraffina, venivano sezionati a 4 µm di spessore e le sezioni ottenute colorate con Ematossilina-Eosina.

Ricerca elettronmicroscopica dei virus enterotropi su ultracentrifugato di contenuto intestinale. I campioni

prelevati dal tenue e dai ciechi venivano trattati come precedentemente descritto (3). L'osservazione dei preparati è stata condotta in ordine casuale e alla cieca esaminando il singolo campione per almeno 15 minuti.

Esame batteriologico per ricerca di Salmonelle. Veniva effettuato con le comuni procedure di laboratorio. I ceppi sospetti venivano identificati con sieri agglutinanti, senza una tipizzazione completa, ma limitatamente alla attribuzione al sierogruppo secondo la classificazione di Kauffman.

Risultati

Tutte le 4 partite di tacchinotti seguite nel corso di questo lavoro non hanno presentato problemi sanitari di rilievo per la durata dei prelievi, mentre nei 5 gruppi sintomatici al momento del prelievo la forma morbosa aveva le caratteristiche più sopra descritte.

Risultati delle ultracentrifugazioni. L'esame dei campioni raccolti è ancora in corso e pertanto possono essere forniti solo i dati parziali ottenuti. Questi riguardano le partite C 1 e C 2 e i campioni S 1, S 3 e S 4. Nella partita C 1 i virus enterici, dopo una fugace comparsa di enterovirus in un soggetto di 9 giorni, erano rappresentati da Coronavirus-like in più campioni degli ultimi prelievi. Nella partita C 2 fino a 21 giorni non venivano riscontrati virus enterici. Nei 3 gruppi sintomatici controllati, S 1, S 3 e S 4, le presenze più frequenti erano rappresentate da Coronavirus-like, soli o in associazione con Rotavirus ed Enterovirus. Tutti comunque erano in numero contenuto.

Risultati batteriologici. Salmonelle sono state isolate da 3 partite controllate su 4. Nella partita C2 sono state isolate 2 salmonelle diverse, una del sierogruppo A e una del sierogruppo C. Dalla partita C3 di nuovo è stata isolata una salmonella di sierogruppo A, mentre nella partita C4 una salmonella del sierogruppo E. Salmonelle del gruppo A sono state isolate anche dagli animali dei gruppi sintomatici S2, S4 e S5.

Risultati istologici. Nei soggetti dei gruppi sintomatici le lesioni enteriche consistevano in quadri di enterite catarrale acuta o subacuta/cronica (S 1, S 2 e S 4). Nei 2 tacchini dei gruppi S 2 e S 5 mancavano del tutto reperti di anormalità. Invece nelle partite asintomatiche sono state riscontrate raramente alterazioni morfologiche in uno o più visceri controllati. Da segnalare sono nella partita C 1 enterite catarrale acuta in entrambi i soggetti di 23 giorni di vita, in coincidenza con la presenza di Coronavirus-like nell'ultracentrifugato; nella partita C 4 lesioni riferibili ad Enterite Emorragica in un unico soggetto di 36 giorni di vita, con presenza di corpi inclusi tipici da Aviadenvirus di gruppo 2 nella mucosa esofagea, enterica, nel fegato e, in misura massima, nella milza. Nei prelievi successivi di 50 e 64 giorni di vita i soggetti di questa partita mostravano aspetti più o meno accentuati di deplezione linfocitaria alla borsa di Fabrizio, al timo e alla milza e quadri di gastrite ed enterite cronica all'ultimo prelievo. Resta da segnalare la presenza quasi costante di una reazione granulomatosa più o meno intensa nel connettivo lasso sottocutaneo adiacente ai lobuli timici

campionati e riferibile alle inoculazioni di vaccini spenti.

Discussione

Nel commentare i risultati bisogna tenere presente che disponiamo di dati parziali per quanto riguarda le ultracentrifugazioni, che comunque rappresentano a nostro parere l'aspetto più interessante del lavoro. Infatti dai nostri dati emerge la coincidenza della presenza di coronavirus-like nel contenuto intestinale dei soggetti della partita C 1 con le lesioni di enterite catarrale acuta in quello che purtroppo è rimasto l'ultimo prelievo, e l'evidenza dello stesso coronavirus-like in tutti 3 i gruppi sintomatici esaminati. Ciò ci sembra sufficiente per concentrare l'attenzione delle prossime indagini sui Coronavirus, il cui ruolo nella patologia enterica del tacchino è noto da tempo (4). Pur con difficoltà logistiche ed organizzative, soprattutto per chi doveva seguire le partite in campo, è stato raccolto materiale in notevole quantità che, alla fine degli esami ancora in corso, si spera possa contribuire a definire un quadro completo e leggibile anche se non esauriente delle forme enteriche osservate in campo. Il panorama delle infezioni circolanti negli allevamenti commerciali di tacchino è sicuramente molto complesso e tra le infezioni virali non si può dimenticare l'Enterite Emorragica, riscontrata in una delle partite controllate (C 4), sia nella sua forma clinica sia soprattutto nei suoi effetti di immunosoppressione (5). E' vero che contro questa malattia gli animali vengono vaccinati, ma in base all'esperienza personale spesso si ha l'impressione che l'infezione diffonda comunque nei tacchini peggiorandone la produzione. Sarebbe interessante verificare se la circolazione dell'infezione naturale è in rapporto temporale con le forme enteriche osservate o con altri eventuali problemi sanitari.

Circa i dati sull'isolamento di Salmonelle, esse risultavano presenti sia in assenza sia in presenza di sintomatologia enterica, ma non in modo costante. Inoltre i ceppi isolati non appartenevano alle specie di maggior prevalenza e patogenicità (*Salmonella enteritidis* e *typhi-murium*). Pur non escludendo che possano comunque contribuire ad aggravare la forma enterica, non ci sentiamo di riconoscere loro un ruolo importante, anche sulla base dei deludenti risultati di trattamenti antibiotici.

Bibliografia

1. Grilli G., Battistoni F., Rampin T., Bernardi Z., Gallazzi D. (2001) Osservazioni sulla presenza di coccidi in tacchini commerciali. *Large Animals Review*, n.6: 69-70
2. Reynolds D. (1992) Enteric Viral Infections of Young Poultry. *Poultry Science*, 4: 197-212
3. Sironi G., Melgari F., Grilli G., Rampin T. (1997) Monitoraggio sulla presenza di virus enterici nell'agianotto nel corso di una stagione riproduttiva in un allevamento lombardo. *La Selezione Veterinaria*, 8-9, 747-756.
4. Nagaraja K.V., Pomeroy B.S. (1997) Coronaviral enteritis of turkeys (Bluecomb disease) in: *Diseases of Poultry*, ed. Calnek B.W., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
5. Rautenschlein S., Sharma J.M. (2000) Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys. *Dev Comp Immunol*, 24: 237-246.

COMUNICAZIONE 4

EFFICACIA DI AVINET® NELLA PREVENZIONE DELLE COLIBACILLOSI DEL BROILER E SUOI EFFETTI SU ALCUNE PERFORMANCES ZOOTECNICHE

L. GIOVANNETTI, K. DUHAXHIU, M.C. CASTELLO
Italia Pegasus Institute, Forlì

Parole chiave: Bioflavonoidi, acido citrico, acido ascorbico, *E. coli*, Broiler, GCP, prove di campo.

Field Study about the efficacy of AVINET® in the prevention of broiler's Colibacillosis and evaluation of some zootechnical parameters related to its utilisation

Key words: bioflavonoids, citric acid, ascorbic acid, *E. coli*, broiler, GCP, field trial

Summary: Authors have tried the efficacy of AVINET® (product based on bioflavonoids, citric acid, ascorbic acid and lactic acid) on *E. coli* presence in the gut of broilers and on zootechnic performances.

Correspondence: Dr. Luciano Giovanetti: c/o Italia Pegasus Institute - Via N. Sacco, 11 47100 Forlì avihome@tin.it

Introduzione

Nell'ambito delle c.d. terapie di massa somministrate negli allevamenti intensivi, in seguito alle numerose problematiche relative ai residui indesiderati di prodotti ad azione farmacologica, alle problematiche relative alla questione dell'impatto ambientale e, non ultimo, alle sempre più pressanti e gravi situazioni di ceppi batterici antibiotico-resistenti, si cercano di utilizzare sempre più prodotti "naturali" che, pur avendo un'efficacia accettabile, non risultino coinvolti nelle problematiche di cui sopra. A fronte di ciò si è proceduto a sperimentare "in campo" il mangime complementare della Soc. Herbotec Srl, denominato AVINET® (a base di bioflavonoidi, ac. citrico, ac. ascorbico ed ac. lattico) per valutare la sua efficacia nella prevenzione delle colibacillosi e sulle performances zootecniche.

Materiali e metodi

L'allevamento era costituito da un'unica costruzione in muratura, suddiviso internamente in due boxes che ospitavano 2.000 capi ciascuno. Gli impianti di alimentazione e di fornitura dell'acqua di bevanda erano separati per ciascun gruppo di animali oggetto della sperimentazione ed asserviti rispettivamente a due silos distinti e due serbatoi diversi. La ventilazione era assicurata da estrattori ed il riscaldamento avveniva attraverso cappe alimentate con GPL. La sperimentazione è iniziata al momento della introduzione dei 2 gruppi di animali in allevamento e si è conclusa all'età di 82 gg. ossia il giorno di invio dei suddetti allo stabilimento di macellazione. La sperimentazione è stata condotta su 2 gruppi di polli colorati da carne, razza New Red, composti ciascuno da 2.000 capi all'accasamento. Gli animali reclutati per la sperimentazione venivano governati dagli addetti dell'allevamento, secondo la prassi in uso, e garantendo il benessere degli animali selezionati per la sperimentazione. Ambedue i gruppi di animali sono stati alimentati *ad libitum* attraverso un mangime completo biologico al 95% per polli colorati da carne. L'acqua di bevanda è stata disponibile agli animali in maniera continua attraverso abbeveratoi di comune uso negli allevamenti di polli da carne (bell drinkers).

I gruppi di trattamento sono stati:

Gruppo 1 AVINET®: AVINET® dal 2° al 7° giorno di età aggiunto in maniera continuata alla dose di gr. 100 per ogni 100 lt. di acqua di bevanda, dal 16° al 19° giorno di vita AVINET® è stato aggiunto alla dose di gr.50 per ogni 100 litri di acqua di bevanda, ed alla stessa dose

di gr.50 per ogni 100 litri di acqua di bevanda, dal 30° al 33° giorno di età.

Gruppo 2 CONTROLLO NEGATIVO: Mangime completo senza l'aggiunta di AVINET® in nessuna fase del ciclo di allevamento.

Tutti i soggetti coinvolti nella sperimentazione sono stati sottoposti ai normali trattamenti previsti dall'Azienda per questo tipo di allevamento quali:

- Vaccinazione contro la Malattia di Marek (bivalente - iniezione - incubatoio).
- Vaccinazione contro la Pseudopeste Aviare e la Bronchite Infettiva (attenuato - spray - incubatoio).
- Vaccinazione contro la Pseudopeste Aviare e la Colibacillosi (spento - iniezione - incubatoio).
- Vaccinazione contro la Coccidiosi con vaccino vivo Paracox 5 (spray - incubatoio).
- Vaccinazione contro la Malattia di Gumboro (vivo attenuato - idro - 16 gg).

I principali criteri di valutazione della risposta al trattamento, sono stati :

- N° *E. coli* per gr. di contenuto interstinale espresso in unità formanti colonie (ufc/gr. di campione).
- Incidenza delle infezioni da *E.coli* nel gruppo trattato con AVINET® in relazione al gruppo non trattato.
- IC nel gruppo trattato con AVINET® in relazione al gruppo non trattato.
- Percentuale di mortalità nel gruppo trattato con AVINET® in relazione al gruppo non trattato.
- Kg di carne ottenuti nel gruppo trattato con AVINET® in relazione al gruppo non trattato.
- Peso medio all'invio al macello nel gruppo trattato con AVINET® in relazione al gruppo non trattato.

L'esame clinico, la rilevazione dei soggetti venuti a morte e l'esame necroscopico sono stati effettuati, in ambedue i gruppi coinvolti nello studio, dal giorno 1 (G1), arrivo dei pulcini di 1 giorno presso le strutture di allevamento, al momento dell'invio dei soggetti presso lo stabilimento di macellazione (GC).

Tutti i dati derivanti dalle osservazioni cliniche sono stati codificati e raggruppati onde a permettere la loro inclusione nello studio statistico.

Tutti i dati derivanti dal continuo esame necroscopico sono stati codificati e raggruppati onde a permettere la loro inclusione nello studio statistico.

Sono stati prelevati tutti gli animali trovati morti e di ognuno è stato effettuato l'esame necroscopico. Nel caso di lesioni riferibili ad *E.coli* si è proceduto

all'esame batteriologico per la ricerca di *E. coli*. In caso di presenza di lesioni anatomo-patologiche (punteggio 1-4) si è proceduto all'esame colturale per ricerca *E. coli* dai tessuti con lesioni previa semina diretta sui terreni HEA ed AS. Si è proceduto, inoltre, al conteggio di *E. coli* per g di contenuto intestinale (pool di campioni di intestino di 4-5 soggetti vivi sacrificati, per gruppo) espresso in unità formanti colonie - ufc/g di campione. La prova del conteggio di *E. coli* è stata effettuata in due momenti: dopo il secondo trattamento (all'età di 20-25 giorni) ed il terzo trattamento (all'età di 35-40 giorni) sia nel gruppo trattato che nel gruppo di controllo.

Risultati

Numero di *E. coli* per gr. di contenuto intestinale espresso in unità formanti colonie (ufc / gr.) (Tabella 1)

Tabella 1: Numero di *E. coli* nel contenuto intestinale (ufc/gr)

Table 1: Number of *E.coli* in the intestinal contents (cfu/gr)

Età degli animali	Nr. animali prelevati per ogni gruppo	<i>E. coli</i> ufc / gr	
		Avinet®	Controllo
22 gg.	5	40 x 10 ⁹	60 x 10 ⁹
40 gg.	5	20 x 10 ⁶	15 x 10 ¹⁰

Incidenza delle infezioni da *E.coli*: in ambedue i gruppi non si sono evidenziate situazioni cliniche ed anatomo-patologiche riferibili a colisetticemia.

Indice di conversione (IC): l'indice di conversione (IC) del gruppo di animali trattato con AVINET® è stato pari a 3,243. L'indice di conversione (IC) del gruppo di controllo non trattato è stato pari a 3,434.

Percentuale di mortalità: la mortalità del gruppo di animali trattato con AVINET® è stata di 248 soggetti con una percentuale riferibile al 12,40%, la mortalità del gruppo di animali di controllo è stata di 320 soggetti con una percentuale riferibile al 16,00%.

Peso medio all'invio al macello: il peso medio del gruppo di animali trattato con AVINET® è stato di kg.2,320 mentre il peso medio del gruppo di animali costituenti il controllo è stato di kg.2,319. Pur essendo stato svolto su una percentuale superiore al 5% degli animali presenti (200 animali), non si è messa in evidenza alcuna significatività per l'elevata variabilità presente all'interno del gruppo. Probabilmente la minore densità del gruppo di controllo, causata da un valore di mortalità superiore, ha permesso agli animali un recupero del peso, visto l'età di macellazione molto avanzata.

Kg di carne ottenuti: i Kg totali di carne ottenuti nel gruppo di animali trattato con AVINET® sono stati 4.064 (1.752 soggetti) , mentre nel gruppo di controllo 3.896 (1.680 soggetti).

Discussione

Dai dati sperimentali ottenuti si evidenzia l'efficacia del mangime complementare denominato AVINET® nel controllo delle colonizzazioni da *E.coli* nel tubo digerente effettuando così una decisa azione preventiva nei confronti delle colibacillosi in genere e migliorando, di conseguenza, tutti i parametri zootecnici correlati ad un migliore funzionalità dell'apparato gastroenterico. In particolare il numero di *E.coli*, mediamente, presenti nel tratto intestinale del gruppo trattato risulta essere di oltre 5 volte inferiore rispetto al gruppo di controllo. Notevoli e rimarchevoli differenze a favore del gruppo trattato sono nettamente rilevabili analizzando i parametri mortalità, carne prodotta e, non ultimo il valore relativo all'indice di conversione. Inoltre, anche dal punto di vista delle problematiche relative ai residui, all'impatto ambientale e alle economie aziendali, la sperimentazione ha dimostrato che la scelta di utilizzare prodotti naturali come l'AVINET® nella prevenzione delle colibacillosi, risultata essere, senza ombra di dubbio, in relazione ai dati ottenuti, una valida opzione per il professionista e per le aziende coinvolte nella filiera avicola.

Bibliografia

1. AA.VV.-Good Clinical Practice for the Conduct of Clinical Trials for Vet. Med. Products - FEDESA1994.
2. Booth H.N. & Mc Donald E.L.- Veterinary Pharmacology and Therapeutics - Ames, 1982.
3. Calnek B.W. - Patologia Aviaria - X Edizione - Piccin, 2001.
4. Fukui H. et alii – Natural infection with attaching and effacing *E.coli* (O 103:H⁻) in chicks – Avian Diseases, 1995.
5. Gahlinger P.M. & Abramson J.H.- PEPI 2.07 Computer program for epidemiologic analysis- Stone Mountain, GA, USA, 1995
6. Goren E. - Observation on experimental infection of chicks with *E.coli* - Avian Pathology, 1978.
7. JMP® V.3.2.2. SAS Institute Inc., 1989 - 1997.
8. Neumayer P. – Antibiotici naturali – red edizioni, COMO 2001.
9. Noordhuizen J.P.T.M. et al.- Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology - Wageningen Pers, 1997.
10. Wooley R.E. et alii – Effect of normal intestinal flora of chickens on colonization by virulent colicin V – producing, avirulent, and mutant colicin V – producing avian *E.coli* – Avian Diseases, 1994.

COMUNICAZIONE 5

CONSIDERAZIONI SUGLI ISOLAMENTI DI CAMPYLOBACTER TERMOFILII OTTENUTI DAGLI ANIMALI E DALL'AMBIENTE: RISULTATI PRELIMINARI

L. DIPINETO¹, G. MATTEOLI¹, F. DI PRISCO², M.C. LANDOLFI², S. MONTAGNARO¹, L.F. MENNA¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli Federico II

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno Sez. Avellino

Parole chiave: Campylobacter termofili, galline ovaiole, ambiente

Consideration on Campylobacter isolation from animals and environment: preliminary results

Key words: Campylobacter thermophilus, laying hens, environment

Summary: An investigation on 6 flocks of laying hens was carried out in order to evaluate the correlation between environment contamination and animal infection by Campylobacter spp. Our results showed how these two parameters are correlated and influenced by rearing management.

Correspondence: Lucia Francesca Menna, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II. E-mail: menna@unina.it

Introduzione

Le tossinfezioni indotte da microrganismi termofili del genere Campylobacter vengono segnalate con frequenza sempre maggiore nell'uomo raggiungendo, nei paesi industrializzati, una incidenza che spesso supera le tossinfezioni da Salmonella spp. (3,4). In natura i principali serbatoi di Campylobacter termofili sono rappresentati dagli uccelli e, in particolare, dai volatili domestici con percentuali di positività di circa il 75% nei broiler e 80% nelle ovaiole (3).

La trasmissione dell'infezione avviene per via orizzontale con una tipica diffusione a macchia d'olio (3). L'infezione sarebbe dunque acquisita dopo la schiusa, mediata dai numerosi vettori (animati e inanimati) che i Campylobacter spp. sfruttano nel loro ciclo biologico.

Il ruolo di vettore è svolto principalmente dalla lettiera e da tutte le strutture interne ai capannoni (gabbie, mangiatoie, abbeveratoi, finestre, ventilatori) oltre che dal mangime e dall'acqua di abbeverata contaminati da feci di animali infetti (6). Un ruolo epidemiologico importante verrebbe inoltre svolto da altri vettori quali insetti, roditori, animali domestici e selvatici, nonché dagli operai addetti all'allevamento mediante l'introduzione e la diffusione del germe nei capannoni (1).

Scopo del presente lavoro è quello di fornire un contributo sull'analisi delle correlazioni esistenti tra i Campylobacter isolati dagli animali e quelli isolati dall'ambiente in modo da ampliare le conoscenze sull'ecoepidemiologia di tale microrganismo necessarie per ridurre la prevalenza dell'infezione tra gli animali e la conseguente trasmissione all'uomo.

Materiali e Metodi

Campionamento: Da settembre 2001 a giugno 2002 sono stati effettuati 300 campioni in 6 allevamenti di galline ovaiole distribuiti nella regione Campania. Gli animali controllati erano circa 96.900, allevati in gabbia, all'interno di capannoni condizionati. L'età degli animali e la consistenza dei gruppi controllati è riportata in tabella 1.

In ogni allevamento sono stati effettuati 50 prelievi, di cui: 30 tamponi cloacali, 5 tamponi ambientali (pareti, sistema di ventilazione, gabbie), 5 prelievi di mangime dalle canalette di alimentazione, 5 di acqua prelevata dagli abbeveratoi e 5 di acqua prelevata dalle vasche di distribuzione.

Isolamento ed identificazione: I passaggi necessari per l'isolamento di Campylobacter termofili sono stati effettuati seguendo la metodica consigliata da Di Modugno G. *et al.*, 1997 (1). I ceppi di *C.jejuni* isolati in due allevamenti (All. B,C) sono stati sottoposti a genotipizzazione utilizzando la PCR-RFLP per il gene della flagellina A (*flaA*) seguendo le metodiche consultate in letteratura (7).

Risultati

I risultati della nostra indagine hanno evidenziato la presenza di *Campylobacter* termofili in 5 dei 6 allevamenti controllati. Dai prelievi effettuati 152 sono risultati positivi, inoltre, mediante le prove d'identificazione biochimica è stato possibile differenziare la specie: 133 ceppi sono risultati *C.jejuni*, 17 *C.coli*, 2 *C.upsaliensis*; non sono stati invece isolati *C.lari*.

Le percentuali di positività dei tamponi cloacali e dei campioni ambientali sono riportate nella tabella 2.

L'analisi dei profili di restrizione dei 14 ceppi di *C.jejuni* genotipizzati dell'allevamento B, ottenuti con *Hinfl*, ha evidenziato 5 profili di restrizione diversi; la digestione con l'enzima *Ddel*, 5 profili di restrizione contenenti un numero molto elevato di bande; la digestione dei 34 ceppi (*C.jejuni*) dell'allevamento C con *Hinfl*, 7 profili di restrizione diversi. Classificare i campioni dell'allevamento C (n.34) digeriti con *Ddel*, nei diversi gruppi (n.14) ottenuti, è risultata più complessa per il numero elevato di bande.

I ceppi dell'allevamento B che hanno presentato un profilo di restrizione identico per entrambe gli enzimi di restrizione sono stati 5 sui 14 analizzati (35,71%) mentre, nell'allevamento C, sono stati 14 su 34 analizzati (41,17%).

Discussione

Anche se la presente ricerca risulta la fase iniziale di uno studio più ampio volto ad apportare un contributo alle conoscenze sulla epidemiologia delle infezioni da Campylobacter termofili, il primo aspetto da porre in rilievo concerne l'andamento dell'infezione in relazione all'età. Nelle prime settimane di vita, infatti, risultava nulla, mentre si positivizzava in età adulta. Tale andamento risulterebbe tipico di una trasmissione per via orizzontale piuttosto che per via verticale, con un'infezione acquisita dunque dopo la schiusa.

Gli animali adulti, invece, presentavano una elevata diffusione dell'infezione, con una percentuale variabile dal 54,2% al 100%. Quindi il germe si presenterebbe

in maniera consistente anche in animali sempre allevati in gabbia, come le galline ovaiole, in condizioni che non sembrerebbero favorire la diffusione del germe attraverso il consueto ciclo oro-fecale.

Inoltre, è emerso un andamento decrescente della percentuale d'infezione con il progredire del ciclo produttivo. Questo dato riportato anche in letteratura non è pienamente spiegabile allo stato attuale e pertanto richiede ulteriori approfondimenti (2).

La genotipizzazione dei diversi isolati di *Campylobacter jejuni* effettuata mediante PCR-RFLP ha evidenziato la presenza nello stesso allevamento di diversi ceppi, contrariamente a quanto ci si attenderebbe in questa tipologia d'allevamento.

Tale osservazione è supportata dai dati presenti in letteratura che descrivono una marcata instabilità del genoma e una elevata variabilità dei geni che codificano per le proteine di superficie (5,8).

Più complessa invece si è rivelata la interpretazione della correlazione esistente tra la contaminazione ambientale da *Campylobacter* termofili e la relativa percentuale di animali infetti. In proposito la letteratura forniva evidenze di un andamento correlato dei due parametri, mentre i nostri dati si discostano in maniera significativa da quelli attesi. Una analisi più approfondita ha consentito di spiegare questo apparente divario in virtù del tempo di permanenza relativamente breve degli animali nei capannoni (All.B) e delle diverse tecniche di allevamento (All.D e F) caratterizzate dall'applicazione di norme igienico-sanitarie più accurate ed appropriate.

Da quanto esposto, l'introduzione di adeguate norme di profilassi obbligatorie, come è avvenuto per la *Salmonella enteritidis*, sarebbe auspicabile al fine di ridurre l'infezione e la conseguente contaminazione dei prodotti alimentari di origine aviaria poiché, come

Tabella 1: Età e consistenza dei gruppi esaminati

Table 1: Age and number of flocks investigated

Allevamento	A	B	C	D	E	F
N° Animali	6.500	7.400	14.500	15.000	35.500	18.000
Età (sett.)	2	17	22	35	51	104

già accennato, questa infezione sta rappresentando un notevole problema anche per la salute pubblica.

Bibliografia

1. Di Modugno G., Camarda A., Nasti R. (1997) Introduzione e propagazione di *Campylobacter jejuni* in allevamenti di boiler. Presenza del germe su cute prima della macellazione e possibile influenza sulla contaminazione delle carni. *Sel. Vet.* 8/9:757-767
2. Di Modugno G., Nasti R., Camarda A. (1998) Ricerche sulla presenza di *Campylobacter jejuni* nell'apparato riproduttore di ovaiole in deposizione. *Sel. Vet.* 9: 637-643
3. Di Modugno G., Camarda A., Circella E., Ficarella V. (2000) Aspetti epidemiologici delle infezioni da *Campylobacter jejuni* negli allevamenti di pollame. *Sel. Vet.* 11:978-997
4. Euzaby J.P. (1993) Le tossinfezioni alimentari causate da batteri del genere *Campylobacter*. *Summa* 7: 49-58
5. Harrington C.S., Thomson-Carter F.M., Carter P.E., (1997) Evidence for recombination in the flagellin locus of *Campylobacter jejuni*: implication for the flagellin genotyping scheme. *J. Clin. Microbiol.* 35
6. Montrose M.S., Shane S.M., Harrington K.S. (1985) Role of litter in the transmission of *Campylobacter jejuni*. *Avian Dis* 29:392-399
7. Nachamkin I., Huong Ung and Charlotte M. Patton (1996) Analysis of HL and O Serotypes of *Campylobacter* strain by the Flagellin Gene Typing System. *J. Clin. Microb.* 34, 2:277-281
8. Parkill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcer C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallens M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G. (2000) The genome sequence of food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665-668 Macmillan Publishers Ltd <http://www.nature.com>

Tabella 2: Isolamenti di *Campylobacter* spp. in gruppi di galline ovaiole

Table 2: Isolation of *Campylobacter* spp. from laying hens flocks

Campioni prelevati da:	Allevamento A			Allevamento B			Allevamento C		
	N° Campioni	N° positivi	% di positività	N° Campioni	N° positivi	% di positività	N° Campioni	N° positivi	% di positività
Tamponi Cloacali	30	0	0	30	30	100	35	32	91
Ambiente*	6	0	0	5	0	0	9	6	66,6
Mangime	4	0	0	5	0	0	5	1	20
Acqua (abbeveratoi)	4	0	0	5	0	0	3	1	33,3
Acqua (vaschette)	4	0	0	5	0	0	2	1	50
Campioni prelevati da:	Allevamento D			Allevamento E			Allevamento F		
	N° Campioni	N° positivi	% di positività	N° Campioni	N° positivi	% di positività	N° Campioni	N° positivi	% di positività
Tamponi Cloacali	30	29	96,6	32	21	65,6	35	19	54,2
Ambiente*	5	1	20	6	1	16,6	4	0	0
Mangime	5	1	20	3	1	33,3	3	0	0
Acqua (abbeveratoi)	5	0	0	5	2	40	4	1	25
Acqua (vaschette)	5	2	40	3	3	100	3	0	0

*Per ambiente si intendono prelievi effettuati da: pareti, sistema di ventilazione, gabbie, etc.

COMUNICAZIONE 6

INDAGINE SULLA PRESENZA DI ORTHO- E PARAMYXOVIRUS AVIARI IN UCCELLI SELVATICI DELLA CAMPANIA

A. PICCIRILLO¹, A. BAIANO², A. MORENO MARTIN¹, M. CALABRIA², M. SENSALE², S. TROISI³,
A. FIORETTI², P. CORDIOLI¹

¹Reparto di Virologia e Sierologia Specializzata - IZS Lombardia ed Emilia Romagna - Sezione di Brescia

²Dip. Patologia e Sanità Animale, Univ. Di Napoli Federico II

³Osserv. Epidemiologico Fauna Selvatica, Vallo della Lucania (SA)

Parole chiave: *Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, passeriformi, epidemiologia

Monitoring for Ortho- and Paramyxovirus in wild birds in Campania Region (Italy)

Key words: *Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, passerines, epidemiology

Summary: 317 cloacal swabs were collected from wild birds (305 from *Passeriformes*, 1 from *Strigiformes*, 1 from *Columbiformes*, 2 from *Piciformes*, 8 from *Galliformes*) in order to detect avian influenza A viruses and Paramyxoviruses. The survey was carried out in a protected area in Southern Italy (Campania region) between November 2000 and April 2001. Virus isolation was performed according to EU Directive 92/40/EEC and the detection of haemagglutinating agents using HA and sandwich ELISA tests. All the swabs were negative. The results of our investigation represent a further evidence for the minor role played by passerines in spreading avian influenza viruses.

Correspondence: Ana Moreno Martin - Dipartimento Diagnostica Specializzata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia. E-mail: amoreno@bs.izs.it

Introduzione

Da tempo gli uccelli selvatici sono considerati importanti serbatoi di virus influenzali di tipo A e Paramyxovirus aviari, agenti eziologici di due devastanti malattie del pollame domestico (1, 5). In particolare, si ritiene che gli uccelli acquatici, appartenenti soprattutto all'ordine degli *Anseriformes*, rivestano un ruolo centrale nell'ecologia dei virus influenzali e nella loro diffusione e mantenimento in natura, mentre molto raro è l'isolamento di questi virus dai *Passeriformi* (10, 11).

L'ordine dei *Passeriformes* rappresenta uno dei gruppi ornitici più eterogenei. Conta, infatti, oltre 5.000 specie con diverse abitudini alimentari (insettivori, granivori e carnivori) e comportamentali (stanziali, migratori a lungo, medio e corto raggio) (7).

Da un punto di vista epidemiologico, notevole interesse viene rivolto a quelle specie migratorie che, contraendo un più o meno stretto rapporto con ambienti antropizzati, compresi gli allevamenti intensivi di pollame domestico, possono svolgere un ruolo importante nella diffusione e nel mantenimento in natura dei virus (2). Gli spostamenti effettuati da queste specie possono ricoprire anche vasti territori, che si estendono dalla zona Sub-Sahariana fino al Nord-Europa. In particolare, l'Italia è scelta da molte specie come zona di svernamento e nidificazione e come ponte per i Paesi nord europei (8).

La presente indagine è stata effettuata con lo scopo di apportare nuovi dati riguardo al coinvolgimento epidemiologico degli uccelli selvatici, ed in particolare dei *Passeriformi*, nella diffusione dei virus influenzali e dei Paramyxovirus aviari.

Materiali e metodi

Campionamenti: i campionamenti sono stati eseguiti in uccelli selvatici catturati a scopo di inanellamento in un'area della provincia di Salerno all'interno del "Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano". La raccolta dei campioni è stata effettuata nel periodo compreso fra novembre 2000 ed aprile 2001.

Dopo la cattura ed il rilievo dei dati zoologici (identificazione della specie, età, peso, etc.), si procedeva con l'esecuzione di un tampone cloacale

per la raccolta delle feci. I tamponi venivano posti in soluzione salina tampone fosfato (PBS) contenente antibiotici (penicillina e streptomina) in sospensione al 10-20% e così trasportati in laboratorio e conservati a -20°C.

Complessivamente sono stati raccolti 317 tamponi da esemplari appartenenti a 38 specie differenti. Di queste, circa il 90% apparteneva all'ordine dei *Passeriformi*, mentre le rimanenti, rappresentate ognuna da pochi esemplari, erano dei seguenti ordini: *Strigiformes*, *Columbiformes*, *Galliformes* e *Piciformes*. Nella tabella 1 è riportato il numero totale dei campioni eseguiti per specie.

Isolamento virale: dopo centrifugazione (3.000 rpm x 15') e filtrazione (0,45 µm.), i campioni venivano inoculati, per via allantoidea, in uova embrionate di pollo SPF di 9-11 giorni d'età. Dopo 5 giorni di incubazione a 37°C, le uova venivano raffreddate a 4°C ed il liquido allantoideo raccolto. Quest'ultimo veniva sottoposto al test di emoagglutinazione, per rilevare l'eventuale presenza di agenti emoagglutinanti, e ad un test ELISA sandwich con anticorpo monoclonale (Hb65) diretto nei confronti della nucleoproteina A dei virus influenzali (9). Si procedeva poi con un altro passaggio dei campioni risultati negativi.

Risultati

Tutti i campioni esaminati hanno dato esito negativo sia per gli *Ortho-* sia per i *Paramyxovirus* aviari.

Discussione

I risultati ottenuti nella presente indagine non si discostano molto da quanto già riportato da altri Autori. Nel nostro Paese, infatti, molto scarsi sono stati gli isolamenti di virus influenzali dai *Passeriformi* selvatici (3, 6).

Seppur negativi, però, questi risultati non sono da sottovalutare, anzi rappresentano ulteriori dati utili alla comprensione del coinvolgimento dei *Passeriformi* selvatici nella diffusione dei virus influenzali, confermando così il ruolo marginale da essi svolto. In particolare, ciò vale soprattutto per le specie dai noi maggiormente campionate, quali pettirosso, capinera, etc. Per le altre specie esaminate, invece, la

ristrettezza numerica del campione non consente di trarre alcuna considerazione in merito.

Per quanto riguarda i Paramyxovirus, nonostante siano riportati in letteratura alcuni isolamenti dai Passeriformi (4), sembra comunque che la presenza di questi virus sia piuttosto rara, come viene evidenziato anche nella presente indagine.

Da un punto di vista epidemiologico, i dati presentati sembrano essere molto confortanti soprattutto se si considera che, nell'ambito dell'ordine dei Passeriformi, vi sono specie che in particolari condizioni (allevamenti rurali all'aperto, inadeguate reti di protezione anti-passero dei capannoni, etc.), potrebbero avere contatti con i volatili domestici e pertanto rappresentare una fonte di introduzione di virus in queste specie.

Per concludere, riteniamo che il ruolo dei Passeriformi nella diffusione e mantenimento in natura di virus aviari, ed in particolar modo dei virus influenzali rimanga, comunque, un punto ancora da approfondire e pertanto sarebbe auspicabile che esso venga presto chiarito attraverso un'attività di ricerca più costante e su più ampia scala. Infatti, anche se nel nostro Paese e nell'Unione Europea, vengono attuati programmi di sorveglianza epidemiologica riguardanti la presenza sia di virus influenzali che di altri virus, sembra invece mancare un sufficiente flusso informativo tra essi. Ciò sarebbe di notevole importanza al fine di meglio comprendere l'ecologia ed epidemiologia dell'influenza aviare e di altre infezioni virali negli uccelli selvatici.

Ringraziamenti

Gli Autori desiderano ringraziare la Sig.ra F. Adella per la preziosa assistenza tecnica offerta.

Bibliografia

- Alexander D.J. (1997) "Newcastle disease and other Paramyxoviruses" in Calnek B.W., et al., (eds.), "Diseases of Poultry" 10th ed., London, Mosby-Wolfe.
- Alexander D.J. (2000) "A review of avian influenza in different bird species". Vet. Microbiol., 74, 3-13.
- Cervio G., Luini M., Nardelli L., Schild G.C. (1981) "Isolamento di un virus dell'influenza A nella rondine (*Hirundo rustica*)". Atti Soc. It. Sci. Vet., 35, 733-734.
- De Marco M.A., Foni E., Donatelli I., Castrucci M.R., Barigazzi G., Guberti V., Delogu M., Massi A. (1997) "Ricerca di virus influenzali aviari in passeriformi catturati nel Parco Naturale di Migliarino - San Rossore - Massaciuccoli (PI)". Sel. Vet., 8-9, 805-809.
- Easterday B.C., Hinshaw V.S., Halvorson D.A. (1997) "Influenza" in Calnek B.W., et al., (eds.), "Diseases of Poultry" 10th ed., London, Mosby-Wolfe.
- Fioretti A., Papparella V., Menna L.F., Scebbia S., Milone M. (1988) "Primi risultati sull'attività dell'osservatorio epidemiologico contro l'influenza aviare presso il Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò". Clin. Vet., 111 (1-2), 73-78.
- Fratricelli F. (2000) "Uccelli Passeriformi" Calderini Edagricole, Bologna.

- Jonsson L. (1996) "Birds in Europe" Christopher Helm, London.
- Siebinga J.T., de Boer G.F. (1988) "Influenza A viral nucleoprotein detection in isolates from human and various animal species". Arch. Virol., 100, 75-87.
- Stalknecht D.E., Shane S.M. (1988) "Host range of avian influenza virus in free-living birds". Vet. Res. Commun., 12, 125-141.
- Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. (1992) "Evolution and ecology of influenza A viruses". Microbiol. Rev., 56, 152-179.

Tabella 1. Numero di campioni eseguiti per specie
Table 1. Number of cloacal swabs per species

Specie	N° Tamponi
Pettiroso (<i>Erithacus rubecula</i>)	93
Capinera (<i>Sylvia atricapilla</i>)	55
Merlo (<i>Turdus merula</i>)	28
Cinciallegra (<i>Parus major</i>)	17
Passera d'Italia (<i>Passer d. italiae</i>)	14
Tordo bottaccio (<i>Turdus philomenos</i>)	13
Occhiocotto (<i>Sylvia melanocephala</i>)	13
Verzellino (<i>Serinus serinus</i>)	8
Quaglia (<i>Coturnix coturnix</i>)	8
Lui piccolo (<i>Phylloscopus collybita</i>)	7
Cinciarella (<i>Parus caeruleus</i>)	6
Passera scopaiola (<i>Prunella modularis</i>)	4
Fringuello (<i>Fringilla coelebs</i>)	4
Sterpazzola (<i>Sylvia communis</i>)	4
Cardellino (<i>Carduelis carduelis</i>)	3
Verdone (<i>Carduelis chloris</i>)	3
Passera mattugia (<i>Passer montanus</i>)	3
Codibugnolo (<i>Aegithalos caudatus</i>)	3
Codirosso spazzacamino (<i>Phoenicurus ochruros</i>)	3
Usignolo di fiume (<i>Cettia cetti</i>)	3
Scricciolo (<i>Troglodytes troglodytes</i>)	2
Sterpazzolina (<i>Sylvia cantillans</i>)	2
Zigolo nero (<i>Emberiza cirius</i>)	2
Passero solitario (<i>Monticola solitarius</i>)	2
Beccafico (<i>Sylvia borin</i>)	2
Torricollo (<i>Jynx torquilla</i>)	2
Pigliamosche (<i>Muscicapa striata</i>)	2
Rondine (<i>Hirundo rustica</i>)	1
Balia nera (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	1
Gazza (<i>Pica pica</i>)	1
Civetta (<i>Athene noctua</i>)	1
Tortora (<i>Streptopelia turtur</i>)	1
Tordela (<i>Turdus viscivorus</i>)	1
Picchio muratore (<i>Sitta europaea</i>)	1
Forapaglie (<i>Ocrocephalus schoenobaenus</i>)	1
Usignolo (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	1
Lui verde (<i>Phylloscopus sibilatrix</i>)	1
Ghiandaia (<i>Garrulus glandarius</i>)	1
Totale tamponi	317

COMUNICAZIONE 7

EFFICACIA NEL BROILER DELLA VACCINAZIONE CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE CON VACCINI VIVI. ANALISI DI ALCUNI PARAMETRI PRODUTTIVI.

M. TAMBA¹, L. TAFFETANI², R. CALABRESE¹, A. SANTI¹, G. TOSI¹, R. USBERTI²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

²Azienda USL Forlì - Servizio Veterinario

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

Efficacy of live attenuated vaccines against Newcastle disease in broilers. A case-control study on selected production parameters

Keywords: Newcastle disease, protection, vaccination

Summary: A serological survey has been carried out on broilers vaccinated against Newcastle disease virus (NDV) with live attenuated vaccines. Broiler vaccinated twice or three times with attenuated live ND vaccines did not show good umoral immunity. A case-control study carried out to assess differences in selected production parameters between NDV negative and NDV high titres broilers flocks showed an increased mortality (+2‰) in all cases and a longer rearing period (one day) in male cases only.

An economic analysis could be made to assess the cost-effectiveness of NDV inactivated vaccination policy at the hatchery.

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: mtamba@bs.izs.it

Introduzione

Nella primavera del 2000 si sono verificati in Emilia Romagna alcuni focolai di Malattia di Newcastle (ND). Tra le cause collegate al verificarsi dell'epidemia vi erano sicuramente l'aumentata introduzione di animali di specie sensibili da Paesi con differente stato sanitario. Infatti si erano trovati a convivere nelle stesse aree animali provenienti da Paesi indenni da ND con animali provenienti da Paesi Terzi nei quali la malattia è endemica (Marangon, comunicazione personale).

Per contrastare questa epidemia il Ministero della Sanità ha emanato un piano nazionale obbligatorio di vaccinazione con lo scopo di aumentare l'immunità della popolazione avicola italiana. 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 confermato l'obbligo 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 (4).

In un precedente lavoro (3) avevamo verificato che i broiler sottoposti esclusivamente a vaccinazione con vaccini vivi attenuati non mostravano titoli soddisfacenti in HI, con questo lavoro, invece, si è cercato di verificare se l'immunità indotta da tali protocolli vaccinali fosse comunque sufficiente a proteggere gli animali dai danni provocati dalla malattia.

Materiali e metodi

Nel periodo gennaio-luglio 2001, sono stati esaminati al macello mediante il test di inibizione dell'emo-

agglutinazione (HI) 11.288 campioni di sangue prelevati da 574 gruppi di broiler sottoposti a programmi vaccinali che prevedevano esclusivamente l'impiego di vaccini vivi. Sulla base dei titoli rilevati al macello, sono stati individuati 363 gruppi (7.195 campioni) che sono stati così suddivisi (Tab. 1):

- **Casi:** gruppi nei quali più del 50% dei campioni prelevati (di norma 20 per gruppo) sono risultati con titolo HI $\geq 1:32$. Si è ipotizzato che questi gruppi siano venuti in contatto, durante il ciclo produttivo, con virus ND di campo.
- **Controlli:** gruppi nei quali più del 50% dei campioni prelevati sono risultati negativi in HI ($< 1:4$). Si è ipotizzato che questi gruppi non siano venuti in contatto con virus ND di campo durante il ciclo produttivo.

Dei gruppi selezionati sono state quindi rilevate le seguenti informazioni: età alla macellazione, provenienza del gruppo (regionale/extraregionale), sesso, peso alla macellazione, accrescimento medio (calcolato come peso in grammi alla macellazione/età), mortalità (calcolata come differenza percentuale tra il numero di pulcini accasati ed il numero di capi inviati alla macellazione).

L'analisi statistica dei diversi parametri è stata stratificata per sesso. A causa della diversa frequenza dei maschi nei casi e nei controlli, per esaminare i dati nel loro complesso è stato anche creato un set ridotto appaiando per sesso i casi ed i controlli; i 161 gruppi selezionati (122 di femmine, 34 di maschi, e 5 misti) per i casi ed i controlli sono stati estratti casualmente. Le eventuali differenze fra i due gruppi nei diversi parametri sono state saggiate mediante il test U di Mann-Whitney.

Risultati

In Tabella 2 sono riportati i risultati relativi ai parametri esaminati stratificati per sesso, mentre in Tabella 3 sono stati riportati gli stessi parametri e la provenienza del gruppo per il dataset ridotto.

Dall'analisi dei dati riportati risulta che tra i casi ed i controlli non vi sono differenze significative ad esclusione di un leggero aumento (+3.6%) di mortalità nei casi ($Z = -1.84$; $p < 0.05$ significatività ad una coda)

ed un aumento di un giorno della lunghezza del ciclo nei maschi ($Z=-2.08$; $p<0.05$) sempre nei casi.

Analizzando le provenienze dei gruppi, infine, è stata registrata una maggiore frequenza dei casi nei gruppi di provenienza regionale (chi quadro=6.9; $p<0.05$).

Tabella 1: Distribuzione dei titoli alla HI nei gruppi di broiler vaccinati con vaccini vivi.

Table 1: HI titres distribution in broilers vaccinated with NDV attenuated vaccines

Popolazione	N° gruppi esam.	N° Campioni esaminati	% negativi	% non protetti (1:4-1:16)	% protetti ($\geq 1:32$)
Tutta	574	11.288	33.3	28.1	38.7
Casi	195	3.873	5.7	16.4	77.9
Controlli	168	3.322	78.3	14.8	6.9

Tabella 2: Media e deviazione standard dei parametri produttivi esaminati nei casi e nei controlli, stratificati per sesso.

Table 2: Mean and standard deviation of selected production parameters, stratified by sex

Parametri	Femmine		Maschi		Misti	
	Controlli	Casi	Controlli	Casi	Controlli	Casi
N° gruppi	126	122	34	64	8	9
Età (giorni)	41.0 \pm 3.6	40.8 \pm 4.1	54.5 \pm 3.7	55.3 \pm 3.7 ^a	47.6 \pm 6.6	53.7 \pm 6.8
Mortalità %	5.4 \pm 2.7	5.6 \pm 2.3	5.7 \pm 3.3	6.3 \pm 2.9	9.7 \pm 8.3	6.9 \pm 1.5
Peso alla macellazione (kg.)	1.8 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	2.4 \pm 0.7	2.9 \pm 0.5
Accrescimento (Peso in g/età)	44.8 \pm 3.6	45.5 \pm 3.4	59.0 \pm 6.0	58.2 \pm 4.2	50.6 \pm 8.3	54.5 \pm 3.9

^a differenze significative ($p<0.05$)

Tabella 3: Media e deviazione standard dei parametri produttivi esaminati nei casi e nei controlli (dataset ridotto).

Table 3: Mean and standard deviation of selected production parameters (reduced dataset).

Parametri	Controlli	Casi
Numero di gruppi	161	161
Età (giorni)	44.1 \pm 6.7	44.2 \pm 7.4
Mortalità %	5.6 \pm 3.2	5.8 \pm 2.4 ^a
Peso alla macellazione (kg.)	2.1 \pm 0.6	2.2 \pm 0.6
Accrescimento (peso in g/età)	48.0 \pm 7.3	48.4 \pm 6.3
Provenienza regionale (N. di gruppi)	113	133
Provenienza extraregionale (N. di gruppi)	48	28

^a differenze significative ($p<0.05$)

Discussione

La verifica della corretta esecuzione dei piani vaccinali obbligatori è generalmente eseguita attraverso indagini sierologiche. Nel caso dei broiler vaccinati più volte con vaccini vivi attenuati, l'immunità umorale indotta non appare elevata (3).

Nonostante ciò, dall'analisi dei parametri produttivi, sembra che i broiler vaccinati almeno due volte con vaccini vivi siano comunque sufficientemente protetti nei confronti dei virus ND di campo.

Anche se non è stato possibile identificare i ceppi di virus ND e valutarne la patogenicità, deve essere sottolineato il fatto che i gruppi di provenienza regionale erano più frequenti tra i casi. Dal momento che l'Emilia Romagna è stata la regione nella quale più pesantemente si è manifestata la ND durante il 2000, è logico supporre che in questa regione, esaurita la fase epidemica, il virus velogeno abbia continuato a circolare nella popolazione vaccinata; è noto infatti che la vaccinazione per ND, se non accompagnata da una alta immunità umorale, non impedisce l'infezione e l'escrezione virale (4). Nel caso si scelga di vaccinare esclusivamente con vaccini vivi è quindi opportuno mantenere la politica vaccinale per lunghi periodi, anche se non vengono più evidenziati focolai di malattia.

Nei gruppi infetti sono comunque stati rilevati un leggero aumento della mortalità e della lunghezza del ciclo. Allo scopo di ottenere anche una valida immunità umorale, potrebbe essere utile effettuare una vaccinazione con virus inattivato all'incubatoio. A tale proposito sarebbe opportuno valutare se il maggior costo della vaccinazione con vaccino inattivato in incubatoio, che mostra di conferire anche una buona immunità umorale (3), copre i costi di una maggiore mortalità (2%) e di un giorno in più di allevamento nei maschi.

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. Tamba M., Tosi G., Massi P., Bacchiocchi F., (2001). Valutazione dell'efficacia nel broiler di diversi piani vaccinali contro la malattia di Newcastle. Large An. Review, 7(6), 89-90
4. 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.

COMUNICAZIONE 8

SORVEGLIANZA DELLE SALMONELLOSI NELLE OVAIOLE. RISULTATI DI UNA INDAGINE AL MACELLO

M. TAMBA¹, M. COCCHI¹, F. FERRI², P. MASSI¹, A. SANTI¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, ²Azienda USL Cesena - Servizio Veterinario

Parole chiave: Salmonella, galline ovaiole, sorveglianza, macello.

Salmonellosis surveillance on egg-laying hens. Results of a survey at slaughterhouse.

Keywords: Salmonella, layer hen, surveillance, slaughterhouse

Summary: A survey has been carried out at slaughterhouse on 330 spent hens from 11 different flocks. *S. enteritidis* (SE) was isolated from 13 hens (3,9%), coming from 4 different flocks (36,4%). Serological tests (RAT, SAT with SG antigen, and ELISA with SE antigen) performed on the same hens showed unsatisfactorily values of sensibility and specificity. Bacteriological control of spent hens at slaughterhouse seems to be a helpful tool to assess the goodness of monitoring systems performed during the laying period.

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: mtamba@bs.izs.it

Introduzione

Diversi piani nazionali di controllo delle Salmonelle (1, 2, 4) prevedono il controllo delle ovaiole alla fine del ciclo produttivo. Lo scopo di questa tipologia di controllo è quello sia di migliorare la stima della prevalenza delle contaminazioni da salmonella nelle galline ovaiole, individuando gli animali che possono essere sfuggiti ai controlli effettuati nel corso del ciclo produttivo, sia di permettere la valutazione della sensibilità dei sistemi di sorveglianza attivati durante il ciclo produttivo.

Tale tipologia di controllo permette, in caso di positività, l'individuazione dei capannoni nei quali effettuare disinfezioni ambientali più accurate, a garanzia del mantenimento dello stato sanitario del gruppo successivo.

Materiali e metodi

L'indagine è stata svolta durante il periodo agosto 2000 - settembre 2001, in collaborazione con i servizi veterinari dell'Azienda USL di Cesena. Il prelievo degli animali da esaminare è stato eseguito al macello: da ciascun gruppo da controllare sono stati scelti casualmente 30 animali; tale controllo è in grado di evidenziare i gruppi nei quali più del 10% degli animali è infetto da salmonella (l.f. 95%). Le galline, in buono stato clinico, sono state quindi inviate vive alla Sezione Diagnostica IZS di Forlì che ha provveduto a prelevare da ciascun animale un campione di sangue e gli organi più significativi per l'esame batteriologico

(fegato e bile, ovaio e ovidutto, intestini ciechi). Tutti gli animali sottoposti a prelievo sono stati esaminati singolarmente. Per ciascun gruppo sottoposto a controllo, inoltre, sono state raccolte alcune informazioni di interesse epidemiologico attraverso una scheda standardizzata, che fungeva anche da documento di accompagnamento dei campioni.

Risultati

In tal modo sono state esaminate in totale 330 galline ovaiole appartenenti a 11 diversi gruppi. Le informazioni reperite sono sintetizzate nella Tabella 1. Tutti gli animali erano galline allevate in batteria. Le uova prodotte erano destinate a centri di imballaggio (5/11 gruppi) o a stabilimenti per la trasformazione in ovoprodotti (6/11 gruppi). Gli animali esaminati presentavano, inoltre, un'età superiore alle 75 settimane e solo in 2 gruppi era stata effettuata la muta.

I risultati degli esami batteriologici sono sintetizzati in Tabella 2. I dati emersi da questi controlli sono molto differenti da quelli ricavati da indagini precedenti svolte in allevamento (3): *S. enteritidis* (SE) è stata isolata in 4 gruppi (36,4%) e da 13 animali (3,9%), mentre non è stata evidenziata la presenza di *S. typhimurium* o di *S. gallinarum*. Sono invece stati isolati altri 5 ceppi di salmonelle c.d. minori; è interessante notare come in un gruppo dove ben 10/30 animali sono risultati positivi per salmonelle oltre a *S. enteritidis* sono stati rilevati altre 3 specie di salmonelle minori.

Tabella 1: Controlli nelle galline ovaiole a fine ciclo. Principali informazioni raccolte

Table 1: Spent hens control at slaughterhouse. Epidemiological data collected

Gruppo	Età (settimane)	Muta	Tutto pieno / Tutto vuoto	Vaccinazione per SE e/o SG	Indirizzo produttivo	Tipologia di allevamento	Destinazione Uova	Presenza Salmonelle	
								Durante il ciclo	Nell'azienda in toto
1	76	No	No	Sì ⁽¹⁾	U.consumo	Batteria	Industria	Sì (SG)	Sì
2	90	No	No	No	U.consumo	Batteria	c.imballaggio	No	No
3	76	No	No	Sì ⁽¹⁾	U.consumo	Batteria	Industria	No	No
4	76	No	Sì	No	U.consumo	Batteria	Industria	No	No
5	98	Sì	Sì	No	U.consumo	Batteria	Industria	Sì (SE)	Sì
6	64	No	Sì	No	U.consumo	Batteria	c.imballaggio	No	No
7	74	No	Sì	Sì ⁽²⁾	U.consumo	Batteria	c.imballaggio	No	No
8	67	No	No	No	U.consumo	Batteria	c.imballaggio	No	No
9	112	Sì	Sì	No	U.consumo	Batteria	c.imballaggio	No	No
10	75	No	Sì	No	U.consumo	Batteria	Industria	No	No
11	75	No	Sì	No	U.consumo	Batteria	Industria	No	No

(¹)= vaccinazione per *S. gallinarum* (SG) e *S. enteritidis* (SE); (²)= vaccinazione per *S. enteritidis*.

Tabella 2: Controlli sulle ovaiole a fine ciclo. Risultato degli esami batteriologici.**Table 2:** Spent hens at slaughterhouse. Bacteriological findings (positive/examined).

Gruppo	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. gallinarum</i>	Altre salmonelle
1	0/30	0/30	0/30	0/30
2	0/30	0/30	0/30	6/30 (5: <i>S. braenderup</i> ; 1: <i>S. isangi</i>)
3	3/30	0/30	0/30	0/30
4	2/30	0/30	0/30	8/30 (4: <i>S. blockley</i> ; 3: <i>S. infantis</i> ; 1: <i>S. livingstone</i>)
5	3/30	0/30	0/30	0/30
6	0/30	0/30	0/30	0/30
7	0/30	0/30	0/30	0/30
8	0/30	0/30	0/30	0/30
9	0/30	0/30	0/30	0/30
10	0/30	0/30	0/30	0/30
11	5/30	0/30	0/30	0/30
TOT.	13/330	0/330	0/330	14/330
%	3.9%	0.0%	0.0%	4.2%

Tabella 3: Controlli sulle ovaiole a fine ciclo. Risultato degli esami sierologici nei gruppi infetti e non infetti da *S. enteritidis*.**Table 3:** Spent hens at slaughterhouse. Serological results in SE infected or not infected flocks.

	Batteriologia	Vaccinaz. SE e/o SG	Totale capi	ELISA			SAR			SAL		
				Esam.	Pos.	% Pos	Esam.	Pos.	% Pos	Esam.	Pos.	% Pos
Gruppi infetti da SE (3,4,5,11)	Pos. SE		13	5	5	100%	6	4	66,7%	4	0	0,0%
	Neg.	Si	27	27	27	100%	27	9	33,3%	27	1	3,7%
	Neg.	No	80	46	17	37,0%	46	3	6,5%	2	0	0,0%
Totale in gruppi infetti			120	78	49	62,8%	79	16	20,3%	33	1	3,0%
Gruppi non infetti da SE	Neg.	Si	60	30	0	0,0%	30	30	100%	30	26	86,7%
	Neg.	No	150	63	23	36,5%	43	30	69,8%	30	22	73,3%
Totale in gruppi non infetti			210	93	23	24,7%	73	60	82,2%	60	48	80,0%
TOTALE GENERALE			330	171	72	42,1%	152	76	50,0%	93	49	52,7%

Dal confronto fra i risultati ottenuti e le informazioni raccolte con la scheda informativa emerge anche che per 3 dei 4 gruppi positivi per SE l'evidenziazione della salmonella è avvenuta solamente col controllo di fine ciclo, mentre nel restante gruppo, la presenza di SE era stata rilevata in fase di pollastra, ma mai durante tutto il periodo di deposizione.

Nei gruppi infetti *S. enteritidis* è stata isolata da un minimo di 2 ad un massimo di 5 animali, ciò porta a stimare che nei gruppi infetti la prevalenza di animali portatori fosse compresa, con una probabilità del 95%, tra il 6,1% ed il 18,1% (media 10,8%). A testimonianza dell'efficacia della pratica vaccinale, un gruppo, risultato infetto da *S. gallinarum* durante il ciclo produttivo e vaccinato sia per *S. enteritidis* che per *S. gallinarum*, ha dato invece risultato negativo al controllo di fine ciclo.

Oltre agli esami batteriologici, sui campioni di sangue prelevati sono state eseguite diverse prove sierologiche (SAR e SAL con antigene *S. pullorum-gallinarum* e ELISA con antigene *S. enteritidis*). Probabilmente a causa dello stress subito dagli animali che ha reso il sangue non idoneo alle prove, è stato possibile eseguire tali prove solamente in 6 degli 11 gruppi esaminati. Gli esiti relativi a tali prove sono riassunti in Tabella 3. La sensibilità (probabilità che un animale infetto da SE risulti positivo al test) dei test variava dallo 0% (SAL) al 100% (ELISA); mentre la specificità (probabilità che un animale sano risulti negativo al test) è risultata molto bassa con valori compresi tra il 63,5% (ELISA) e il 26,7% (SAL). Le

performance dei test inoltre sono apparse influenzate dallo stato vaccinale degli animali.

Discussione

Questa particolare tipologia di indagine ha evidenziato la presenza di salmonelle in gruppi nei quali l'isolamento non era avvenuto durante tutto il ciclo produttivo, permettendo così di individuare l'infezione in gruppi ritenuti sani sulla base degli autocontrolli e dei controlli ufficiali effettuati durante il ciclo produttivo. Il controllo a fine ciclo rappresenta quindi un importante strumento per la valutazione dei sistemi di sorveglianza attivati e dell'andamento dei piani di controllo. Risultati non soddisfacenti sono invece stati registrati nelle indagini sierologiche: la sensibilità e la specificità delle prove non appaiono elevate e sembrano influenzate negativamente dallo stato vaccinale degli animali. Questo ne rende sconsigliabile l'utilizzo nell'ambito di un piano di sorveglianza.

Bibliografia

1. Ebel E.D., David M.J., Mason J., 1992. Occurrence of Salmonella enteritidis in the US commercial egg industries: report on a national spent hen survey. Avian Dis. 36(3), 646-654
2. Hinz K.H., Legutko P., Schroeter A., Lehmacher W., Hartung M., 1996. Prevalence of motile salmonellae in egg-laying hens at the end of the laying period. J. Vet. Med. B. 43(1), 23-33
3. Tamba M., Massi P., Marzadori F., Tosi G., Paganelli G., 2000. Un piano di sorveglianza per le salmonelle nel settore avicolo. Risultati preliminari. Sel. Vet. 8-9, 587-599
4. Wierup M., Engström B., Engvall A., Wahlström H., 1995. Control of Salmonella enteritidis in Sweden. Int. J. Food Microbiol. 25(3), 219-226

COMUNICAZIONE 9

RISULTATI PRELIMINARI SU ALCUNI ASPETTI PATOGENETICI DELL'INFEZIONE DA CIRCOVIRUS NEI PICCIONI DA CARNE

M.P. FRANCIOSINI¹, A. LAVAZZA², F. PARILLO¹, G. TACCONI¹, G.ASDRUBALI¹

¹Facoltà di Medicina Veterinaria-Università degli Studi di Perugia

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: piccioni da carne, circovirus, deplezione linfocitaria, immunodepressione

Updated supplement to pathogenesis of Circovirus infection in broiler pigeons

Key words; broiler pigeon, circovirus, lymphocytic depletion, immunodepression

Summary: In order to shed light on some aspects of the pathogenesis of circovirus infection in broiler pigeons, bursal and thymic samples were collected for histological, ultrastructural examinations. Virological investigations by negative staining electron microscopy (NS-EM) and hybridisation test were also performed. Histological examinations revealed lymphocytic depletion associated with the presence of nuclear and cytoplasmic inclusions. The CN-EM detected circoviruses-like particles as from one week of age. The early presence of the viral particles in squabs could be justified by diffusion with crop secretions, but the possibility of a vertical transmission is also suggested.

Correspondence: Maria Pia Franciosini- Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie-Sezione di Igiene e Patologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo 4, 06100 Perugia. Email: mpfra@unipg.it

Introduzione

L'atrofia degli organi linfoidei primari correlata a infezione da circovirus è stata segnalata in Italia a partire dal 1997 (1). Tale forma morbosa è spesso subclinica e difficile da diagnosticare; i sintomi, se presenti, sono spesso espressione di infezioni intercorrenti. La lesione istologica principale è costituita da vari gradi di deplezione linfocitaria e presenza di corpi inclusi nel nucleo e nel citoplasma di linfociti e macrofagi. In precedenza i nostri studi hanno riguardato prevalentemente la presenza dell'infezione in piccioni considerati "scarti" sebbene questa sia stata messa in evidenza anche in soggetti apparentemente sani (2,3). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di individuare il momento di comparsa dell'infezione, al fine di definirne alcuni aspetti patogenetici, in particolare quelli riguardanti le modalità di trasmissione del virus.

Materiali e metodi

Le indagini sono state condotte in un allevamento di piccioni da carne del Centro Italia.

Sono stati prelevati 5 piccioni, apparentemente sani, a partire da una settimana di età fino alla quarta settimana per un totale di 20 soggetti. Sono stati, inoltre, esaminati 10 piccioni considerati scarti, di età compresa tra la prima e la quarta settimana. Previa eutanasia da ogni soggetto sono stati prelevati campioni di timo e borsa di Fabrizio per esecuzione di esami istologici e ultrastrutturali su sezioni fini. Sono state inoltre eseguite indagini virologiche mediante esame al M.E in colorazione negativa (CN-ME) e test di ibridazione in situ (6).

Risultati

I risultati degli esami anatomopatologici, istologici e di CN-ME sono riassunti in Tabella 1. L'alterazione più significativa è costituita dal riscontro istologico della deplezione linfocitaria associata alla presenza dei tipici inclusi nucleari e citoplasmatici. (Figure 1 e 2).

L'osservazione con CN-ME ha permesso il reperto di particelle, prive di envelope, di dimensioni comprese tra i 13-18nm. a partire dalla prima settimana di età. La valutazione semiquantitativa di positività indicava, in due soggetti rispettivamente di 20 e 29 gg di età, una discreta presenza di virioni (3+ in una scala da +/- a 5+ pari a circa 10⁵ particelle/ml). Il test di ibridazione

in situ ha rivelato la presenza del virus solo su 2 campioni provenienti da borse di soggetti di 4 settimane di età, in analogia alle indagini ultrastrutturali condotte su sezioni fini (Figura 3). Queste ultime hanno messo in evidenza, in alcuni casi, sia su elementi bursali che timici, vacuolizzazione citoplasmatica e rigonfiamento mitocondriale con scomparsa delle creste (Fig.4).

Figura 1: Borsa di Fabrizio. Microscopia ottica. Deplezione linfocitaria del follicolo e presenza di corpi inclusi nucleari nelle cellule bursali. Colorazione ematossilina-eosina

Figure 1: Bursa of Fabricius. Light microscopy. Lymphocytic depletion and eosinophil inclusion bodies in the nucleus of bursal cells H&E staining

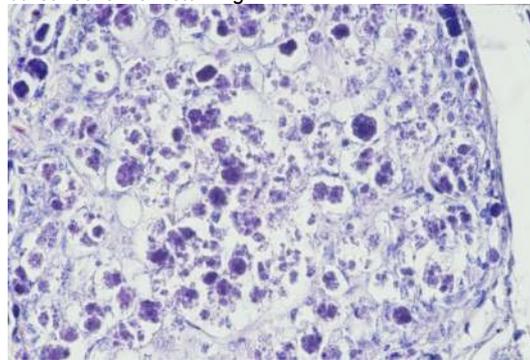


Figura 2: Borsa di Fabrizio. Microscopia ottica. Presenza di corpi inclusi citoplasmatici nelle cellule bursali. Colorazione ematossilina -eosina

Figure 2: Bursa of Fabricius. Light microscopy. Basophilic cytoplasmic inclusion bodies in bursal cells. H&E staining.

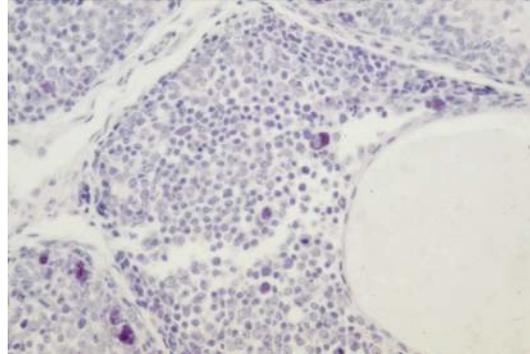


Figura 3: Borsa di Fabrizio. Microscopia elettronica. Aggregati paracrystallini di particelle virali nel nucleo di una cellula bursale.

Figure 3: Bursa of Fabricius. Electron Microscopy. Viral particles in paracrystalline arrays in the nucleus of bursal cell

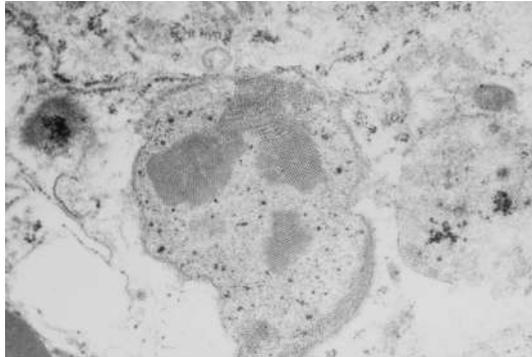
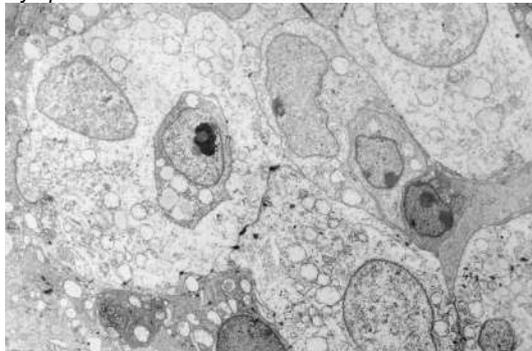


Figura 4: Borsa di Fabrizio. Microscopia elettronica. Vacuolizzazione citoplasmatica delle cellule bursali.

Figure 4: Bursa of Fabricius. Electron Microscopy. Cytoplasmic vacuolisation of bursal cells



Discussione

I risultati ottenuti ci consentono di trarre alcune considerazioni preliminari. In primo luogo, a nostro giudizio, va sottolineato il riscontro del virus, tramite M.E. a colorazione negativa a partire dalla prima settimana di vita e la positività dei campioni che aumenta con l'età, a testimoniare una possibile trasmissione del virus per via orizzontale, diretta o tramite il latte del gozzo. Non va comunque trascurata l'evenienza di una diffusione per via verticale, ipotizzata da alcuni studiosi (4); nella nostra ricerca

Tabella 1: Alterazioni macroscopiche e microscopiche riscontrate in soggetti apparentemente normali e scarti e n° di campioni riconosciuti positivi al M.E in colorazione negativa (tra parentesi la valutazione semiquantitativa di positività)

Table 1: Macroscopic and microscopic changes in healthy and culled pigeons and number of positive samples (in brackets a semiquantitative evaluation of positivity)

Età in settimane	Lesioni macroscopiche	Lesioni microscopiche	C.N. - M.E.**
1 settimana	Nessuna lesione	Nessuna lesione	1/5 (1+)
2 settimana	Nessuna lesione	Nessuna lesione	1/5 (2+)
3 settimana	1/5 atrofia borsa 2/5 atrofia timo	3/5 deplezione linfocitaria (timo e borsa)	4/5 (+/-, 1+, 2+, 3+)
4 settimane	5/5 atrofia borsa 3/5 atrofia timo	5/5 deplezione linfocitaria borsa 3/5 deplezione linfocitaria timo	5/5 (+/-, 2+, 2+,2+, 3+)
Soggetti scarti	10/10 atrofia della borsa e del timo	10/10 deplezione linfocitaria borsa e timo	1/10 (2+)

**campioni costituiti da pool di timo e borsa di Fabrizio

sono state messe in evidenza particelle virali fin dalla prima settimana di vita. Non sempre sono state osservate nelle cellule della borsa di Fabrizio e del timo inclusioni citoplasmatiche e nucleari, sebbene si sia riscontrata deplezione linfocitaria; ciò in accordo con quanto descritto da Paré et al. (4) che hanno riportato la mancanza di qualsiasi tipo di inclusi in soggetti al di sotto delle 4 settimane di età. Va sottolineato, comunque, che la presenza del circovirus non può essere esclusa in assenza di corpi inclusi (6) i quali, peraltro, potrebbero rappresentare un momento transitorio del ciclo replicativo di un virus.

Ulteriori ricerche dovrebbero essere indirizzate alla standardizzazione di tecniche volte a identificare i circovirus, dal momento che i mezzi a disposizione per la loro individuazione sono assai limitati. Metodiche basate sull'applicazione della PCR eseguita con primers degenerati possono rappresentare sicuramente una buona soluzione (5,6), ma al momento necessitano di ulteriori conferme.

Ringraziamenti

Si ringraziano la dott.ssa Joan Smyth e Daniel Todd del Veterinary Science Division - Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland di Stormont, Belfast per l'esecuzione degli esami di ibridazione in situ.

Bibliografia

- Asdrubali G., Franciosini M.P., Coletti M. & Mughetti L. (1997). Osservazioni su casi di atrofia del timo in piccioni da carne. La Selezione veterinaria. 8-9, pp.665-670
- Coletti M., Franciosini M.P., Asdrubali G. & Passamonti F. (2000) Atrophy of the primary lymphoid organs of meat pigeons in Italy associated with circovirus-like particles in the bursa of Fabricius. Avian Diseases 44, pp. 454-459
- Franciosini M.P., Coletti M., Asdrubali G., Passamonti F. & Rossodivita M.E. e Capua I. (1998). Su una particolare forma di atrofia degli organi linfoidi ed ematologiche. La Selezione veterinaria 8-9, pp. 697-706
- Paré J.A., Brash M.L., Hunter B. & Hampson R.J. (1999) Observations on pigeon circovirus infection in Ontario. Canadian Veterinary Journal, 40, pp.659-662
- Todd D. (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. Avian Pathology, 29, pp. 373-394
- Todd D., Weston J.H., Soike D. & Smyth J.A. (2001a). Genome sequence determination and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. Virology, 286, pp.354-36

COMUNICAZIONE 10

APPLICAZIONE DI PIANI VACCINALI NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE NELLO STRUZZO (*Struthio camelus*): RISULTATI PRELIMINARI

P. CASAGRANDE PROIETTI¹, M.P. FRANCIOSINI¹, G. PREDARI², G.ASDRUBALI¹

¹Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Igiene e Patologia, Università degli studi di Perugia;

²Libero professionista

Parole chiave: struzzo, malattia di Newcastle, vaccinazioni, test HI, test SN

Different NDV vaccine strategies in ostriches (*Struthio camelus*): preliminary results

Key words: ostrich, Newcastle disease, vaccination, test HI, test SN

Summary: The aim of this study was to assess the efficacy related to application of different vaccinal programmes in ostriches, according to European Permanent Veterinarian Committee, by immune response evaluation.

Correspondence: Patrizia Casagrande Proietti - Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Igiene e Patologia, Università degli studi di Perugia- Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo 4, 06100 Perugia. Email pcpatavi@unipg.it

Introduzione

Il rapido ed imprevedibile aumento del commercio internazionale di ratiti in particolare dello struzzo (*Struthio camelus*), verificatosi negli anni '90 in Italia e, quindi, anche nella nostra Regione, costituisce una fonte di preoccupazione per le infezioni che tali uccelli possono portare.

Gli struzzi devono essere allevati all'aperto e vengono, quindi, a contatto di uccelli selvatici e di altri animali, con possibile scambio di virus e di vari agenti infettivi. In conseguenza dei recenti episodi di Pseudopeste segnalati nel nostro Paese si è dovuto ricorrere, come prevede il DPR 657/96, all'applicazione di un programma di vaccinazione e monitoraggio approvato dal Comitato veterinario permanente europeo nel luglio 2000. Al momento, per il controllo internazionale della Pseudopeste negli struzzi viene previsto un intervento minimo di due vaccinazioni a distanza di 15 giorni con vaccino vivo attenuato, mentre la vaccinazione con vaccino spento rimane facoltativa. Da alcuni studi (7) sembra che la vaccinazione con vaccino vivo attenuato, stimolando prevalentemente l'immunità cellulo-mediata, non è in grado di proteggere dall'infezione con virus selvaggio; sarebbe necessaria, quindi, per conferire una protezione completa, la somministrazione anche di un vaccino spento che determini una valida risposta umorale (8). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di sperimentare, seppure in maniera preliminare, l'efficacia di diversi piani vaccinali anche alternativi a quanto stabilito dal Comitato veterinario permanente europeo, per valutare la risposta anticorpale da essi indotta.

Materiali e metodi

La sperimentazione è stata effettuata in un allevamento di struzzi del Centro Italia, costituito da circa 300 soggetti. I pulcini alla schiusa sono stati divisi in tre gruppi, ciascuno dei quali è stato sottoposto ad un diverso protocollo vaccinale.

Gruppo A: 12 soggetti vaccinati in schiusa e a 15 giorni con vaccino vivo attenuato ceppo La Sota per via oculo-nasale e ad un mese di età con vaccino spento per via sottocutanea;

Gruppo B: 12 soggetti vaccinati in schiusa contemporaneamente con vaccino vivo attenuato ceppo La Sota per via oculo-nasale e spento per via sottocutanea;

Gruppo C: 12 soggetti vaccinati in schiusa contemporaneamente con vaccino vivo attenuato ceppo La Sota per via oculo-nasale e spento per via sottocutanea e a 15 giorni di età con vaccino vivo attenuato ceppo La Sota per via oculo-nasale.

Nei diversi sistemi di vaccinazione sono state impiegate dosi doppie rispetto a quelle utilizzate nel pollo. Su tutti i gruppi sono stati effettuati 2 prelievi di sangue a 60 gg. e a 90 gg. di età; per la ricerca degli anticorpi vaccinali i sieri sono stati saggiati con test HI ed SN.

Il test HI è stato eseguito secondo quanto prevede la Direttiva CEE 92/66 (CEE,1992), utilizzando 4 unità emagglutinanti di virus. Sono stati considerati positivi titoli di $\log_2 > 3$.

Il test SN è stato effettuato secondo la metodica standard; sono stati valutati positivi titoli di $\log_2 > 1$ (4). Per valutare la eventuale presenza di risultati statisticamente significativi ottenuti con i differenti piani vaccinali è stata valutata l'analisi della varianza ed effettuato il test di Tukey e del χ^2

Risultati

Con l'utilizzazione del test HI è risultato positivo un campione su 9, mentre tutti gli altri sono negativi. I risultati sierologici relativi al test SN (Tabella 1) mostrano una percentuale di positività del 100% nei sieri del primo prelievo e del secondo prelievo del gruppo A con una media dei titoli espressa in \log_2 rispettivamente di 7.0 e di 6.2. I sieri del primo prelievo del gruppo B risultano positivi per il 50% con una media dei titoli di 5.1; nel secondo prelievo la percentuale di positivi è del 36,3%, con un titolo medio di 5.7. In riferimento al gruppo C la percentuale dei sieri positivi è del 62,5% con un titolo medio di 5.1; i sieri del secondo prelievo mostrano una positività del 71,4% con un titolo medio pari a 4.9.

L'analisi statistica non ha mostrato differenze significative nelle medie dei titoli dei sieri dei 3 gruppi; nel calcolo tra le positività e le negatività una debole significatività è stata riscontrata tra il primo prelievo del gruppo A e il primo prelievo del gruppo B ($P = 0,0498$) nonché tra il 2° prelievo del gruppo A ed il 2° prelievo del gruppo B ($P = 0,0345$).

Dicussione

Dall'analisi dei dati, in merito alle metodiche utilizzate, è possibile affermare, come dimostrato da alcuni Autori, che il test HI risulta scarsamente sensibile per

saggiare anticorpi specifici nei confronti di NDV nei sieri di struzzo (6,3), sebbene sia considerato il test standard per la diagnosi di malattia di Newcastle nel pollame (CEE, 92/66). E' stato infatti osservato che l'HI produce risultati inconsistenti, sia per l'alta incidenza dei falsi negativi (1), sia dei falsi positivi (10). Di contro, altri Autori hanno utilizzato il test HI ottenendo una buona correlazione con altre metodiche, come l'ELISA diretta e indiretta e la sieroneutralizzazione (5,2). Quest'ultima può essere considerata la prova più accurata e sensibile per questo scopo (5), come dimostrano anche i risultati da noi ottenuti, sebbene molto complessa e laboriosa.

Per quanto concerne la risposta immunitaria prodotta in seguito all'applicazione dei piani vaccinali, pur riguardando un numero ridotto di campioni, possiamo affermare, che si è verificata una sieroneutralizzazione maggiore nei soggetti appartenenti al gruppo A; infatti, i sieri prelevati dagli struzzi a 60 gg., mostrano una percentuale di positività pari al 100%, con una media aritmetica dei titoli di 7.0 che diminuisce di un logaritmo nei soggetti di 90 gg. E' da sottolineare, comunque, che anche nei soggetti del gruppo B e C la vaccinazione ha stimolato una buona risposta anticorpale nei confronti di NDV; il titolo medio, infatti, oscilla tra 4.9 e 5.7 con percentuali di positività tra il 36,3% e il 71,4%.

Questi risultati, verosimilmente giustificati dal fatto che tutti e tre i piani vaccinali hanno previsto l'utilizzo di un vaccino spento, sono in parte in accordo con quelli ottenuti da Bolte et al., (1999). Tali autori hanno rilevato mediante il test di sieroneutralizzazione un titolo medio di 7.6 in sieri di struzzi adulti sottoposti a vaccinazione prima con vaccino vivo e successivamente con vaccino spento.

Allwright (1), Cadman et al., (3), Verwoerd et al., (9), hanno inoltre, dimostrato, mediante la ricerca di anticorpi con HI ed ELISA, che gli struzzi rispondono alla vaccinazione con vaccini vivi e spenti nei confronti di NDV. Dall'applicazione dei test statistici si osserva la presenza di una debole significatività tra i risultati ottenuti nel gruppo A e B, sia nel primo che nel secondo prelievo, giustificata dall'esiguo numero di campioni.

A tutt'oggi, comunque, sono ancora scarse le conoscenze in merito alla valutazione della risposta immunitaria nei confronti della malattia di Newcastle nello struzzo: la stima dell'immunità umorale non è così diretta e semplice come nel pollo, in relazione anche alla difficoltà di standardizzazione delle differenti metodiche, come dimostrato dai risultati

contraddittori ottenuti in base alle procedure scelte per la determinazione degli anticorpi.

Ringraziamenti

Gli esami sono stati effettuati presso la Sezione di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico di Padova. Si ringraziano la Sig. Anna Toffan e il Sig. Antonio Zuin

Bibliografia

1. Alwright D. (1996). Viruses encountered in intensively reared ostriches in southern Africa. Proceeding of Improving our understanding of Ratites in a Farming Environment (pp.27-33). Oxford U.K.
2. Bolte A. L., Voeckel K. L., Kaleta E.F. (1999). Zur schutzimpfung des Strausses ((*Struthio camelus*, Linne 1758) gegen die Newcastle Krankheit: Nachweis von Impfstoff-Vertraglichkeit und Serokonversion post vaccinationem mittels HAH- und VN-test. Deutsche tiererliche Wochenschrift. 106, 53-84.
3. Cadman H.F., Kelly P.J., De Angelis W. D., Rohde C., Collins N& Zuli T. (1997). Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*). Avian Pat. 27, 117-120
4. Kaleta W. F., Siegman O. (1971). Verchleichende untersuchungen uber den Nachweis hamagglutinations shemmen der und virusneutralisierende Antikörper nach Vaccination gegen die Newcastle Disease. Archiv. Fur Geflugelkunde. 35,79-83.
5. Koch G., Cifra G. & Engstrom B.E. (1998). Detection of Newcastle virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. Veterinary Record, 143, 10-12.
6. Jorgensen P. H., Lomniczi B., Manvell R. J., Holm E. & Alexander D. J. (1998). Isolation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease) viruses from a flock of ostriches (*Struthio camelus*) and emus (*Dromaius novaehollandiae*) in Europe with inconsistent serology. Avian Path. 27, 352-358.
7. Reynolds D. L., Maragua A. D. (2000). Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. Avian Dis. 44(1): 145-154
8. Takada A., Kida H. (1996). Protective response of chickens against Newcastle disease induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. Vet. Microb. 50:17-25
9. Verwoerd D. J., Olivier A., Gummow B., Gerdes G.H., Williams R. (1999). Experimental infection of vaccinated slaughter ostriches in a natural open-air feedlot facility with virulent Newcastle disease virus. Avian disease. 43(3) 442-452
10. Williams R., Boshoff C.H., Verwoerd D., Schoemann M., van Wyk A., Gerdes T. H., & Roos H. (1997). Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. Avian Diseases, 41,864-869

Tabella 1: Riepilogo titoli SN. Media, Deviazione Standard, Mediana e Moda

Table 1: SN titers. Mean, Standard Deviation, Median, Mode

Prelievo	Gruppo A		Gruppo B		Gruppo C	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°
N°positivi	9	6	4	4	5	5
% positivi	100	100	50	36.3	62.5	71.4
Valore Minimo	4	32	0	0	2	0
Valore Massimo	256	256	256	256	64	128
Media dei titoli (log ₂)	7.0	6.2	5.1	5.7	5.1	4.9
Deviazione Stand.	104.8	89.72	89.35	84.75	30.74	44.3
Mediana	128	32	3	2	8	16
Moda	256	32	0	8	64	32
N°campioni	9	6	8	11	8	7

COMUNICAZIONE 11

PROPRIETA' ANTIBATTERICHE DI ALCUNI OLI ESSENZIALI

L. FIORENTINI¹, M.C.CASTELLO²

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

²Libero Professionista

Parole chiave: Oli essenziali, medicina naturale, aromagramma, minima concentrazione inibente (M.I.C)

Antiseptic properties of some ethereal oils

Key words: Ethereal oils, natural medicine, aromagram, M.I.C.

Summary: In this work Authors had checked for the antiseptic properties of some of the most common ethereal oils usually present in many commercial products actually used for therapeutic purposes in poultry industry. Ethereal oils, except of *Citrus Paradisi* seed oil, seem to be more active *in vivo* than *in vitro*, confirmed what already present in literature and also in the field from many years.

Correspondence: Fiorentini Laura c/o Istituto Zooprofilattico. Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna – Sezione di Forlì, Via – Via Marchini 1 – 47100 Forlì. Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Le proprietà antibatteriche degli oli essenziali (OE) sono note da moltissimo tempo, tuttavia la moderna zootecnia industriale, forse per la sua relativa giovinezza, o per indubbi vantaggi economici, ha da sempre rivolto le sue attenzioni agli antibiotici “classici” derivanti dal metabolismo dei miceti o da sintesi chimica e scoperti e sviluppati a partire dal secondo dopoguerra.

Recentemente, la sempre maggior preclusione all'uso di tali molecole, vuoi per disposizione legislativa, vuoi per rispetto e attenzione alla sensibilità del consumatore, ha imposto una maggior attenzione da parte dei veterinari verso quella medicina erroneamente chiamata “alternativa”, che altro però non è che solamente più vecchia per nascita, di almeno alcune migliaia di anni.

Spinti dai confortanti dati di campo e dai riscontri presenti in letteratura abbiamo voluto testare alcuni OE di certa estrazione naturale (simili a quelli abitualmente utilizzati, in miscele, in diversi prodotti commerciali) per il loro potere antibiotico “in vitro” secondo i metodi di valutazione degli antibiotici “tradizionali”.

Materiali e metodi

In questa prova venivano sottoposti ad “aromatogramma” quindi alla M.I.C. (valutazione della minima concentrazione inibente), 30 ceppi batterici di cui 17 di origine suina e 13 di origine aviaria nei confronti di 7 differenti oli essenziali.

Ceppi batterici:

- 6 ceppi di *Salmonella typhimurium* di cui 2 di origine suina e 4 di origine aviaria
- 2 ceppi di *Pasteurella multocida* di origine aviaria
- 11 ceppi di *Streptococcus* spp. di cui 5 di origine suina e 6 di origine aviaria
- 1 ceppo di *Staphylococcus aureus* di origine aviaria
- 6 ceppi di *Escherichia coli* di origine suina di cui:
 - 1 O 149 k88+ LT-
 - 1 O 149 k88+ LT+
 - 1 O 18
 - 1 O 75
 - 2 O 149 K88-
- 4 ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* di cui
 - 2 APL 1 sierotipo 9, 2 APL 2 sierotipo 9

Oli essenziali: OE di agrumi, OE di origano, OE di finocchio, OE di issopo, OE di salvia, OE di lavanda, OE di timo

Aromagramma: consiste in un metodo di misura *in vitro* del potere antibatterico degli oli essenziali. Questo esame è paragonabile a un antibiogramma dove gli antibiotici sono sostituiti con essenze aromatiche preventivamente selezionate e titolate.

M.I.C.: prevede di saggiare la broccoltura batterica contro diluizioni scalari dell'OE allestite in piastre *microtiter*.

Risultati

Gli aromagrammi venivano eseguiti saggiando le broccolture dei ceppi batterici sopra elencati nei confronti di diluizioni scalari (puro, 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) degli OE.

Gli oli essenziali di finocchio, issopo, salvia, lavanda, non hanno mostrato potere inibente a partire dalla sostanza pura nei confronti di tutti i ceppi, di conseguenza procedere con le M.I.C. sarebbe stato inutile. Al contrario gli OE di agrumi, di origano e di timo hanno inibito la crescita di tutti i ceppi fino alla diluizione di 1:10 e ridotto la crescita alla diluizione di 1:100 nessun potere inibente alla diluizione di 1:1000. Per queste ultime tre essenze si è proceduto con le M.I.C.

Le M.I.C. venivano eseguite con diluizioni degli OE con *range* compreso tra 500 µl e 0,9 µl /ml, gli OE di origano e di timo hanno dato valori di minima concentrazione inibente >500 µl /ml nei confronti di tutti i ceppi, l'OE di agrumi ha dato i seguenti risultati: > 500 µl /ml nei confronti di *S. typhimurium*, APL, *S. aureus*, valori compresi tra 250 e 15,6 µl /ml per cinque ceppi di *Streptococcus* spp. (2 di origine suina e tre di origine aviaria). Valori compresi tra > 500 e 31,2 µl /ml per due ceppi di *P. multocida* (di origine aviaria). Valori compresi tra > 500 e 250 µl /ml per due ceppi di *E.coli* (di origine suina)

Discussione

Durante il lavoro svolto ha sorpreso non poco l'osservare che, eccezion fatta per l'OE estratto dai semi di agrumi, non è possibile rilevare attività antisettica “in vitro” degli OE testati se non a dosi elevate, superiori a quelle utilizzate in campo. Peraltro, tali proprietà antimicrobiche, “in vivo” sono ben evidenti sia in campo che in letteratura.

I primi studi scientifici sul potere battericida risalgono al 1887. In questi primi studi si mirava a stabilire una gerarchia di attività antisettica degli OE usando come standard di riferimento il Fenolo.

Recentemente lavori sperimentali condotti da Valnet e Coll (1978) hanno dimostrato come la concentrazione di olio essenziale a livello tissutale (CT) sufficiente a produrre un effetto antibatterico è di 100 volte inferiore alla CMI (concentrazione minima inibente) in vitro.

Da questa osservazione Valnet giunge a sostenere la tesi secondo la quale gli OE non agiscono con un meccanismo antibiotico simile ma piuttosto su ciò che si può definire "terreno organico malato". Infatti non si riscontrano differenze di azione tra diversi chemiotipi dello stesso olio essenziale.

Il problema rimane a tutt'oggi aperto.

Nello studio delle essenze aromatiche risalta notevolmente la discordanza dei risultati pubblicati.

La costituzione chimica degli OE è soggetta a numerose variazioni (stagione, clima, localizzazione della coltura, tecnica di distillazione), non è quindi possibile alcuna sistematizzazione dei risultati in

quanto le essenze aromatiche non sono mai identiche. E' di conseguenza più corretto parlare di risultati provvisori.

Bibliografia

1. Boncompagni E. – Corso di fitoterapia – Aboca – Sansepolcro (AR) 2000
2. Ceruti A. – Piante medicinali e alimentari – Loescher – Torino 1957
3. Belaiche P.- Trattato di fitoterapia e aromoterapia – Institut National de Phytotherapie (Parigi) 1984
4. Fortuna L. – Aromoterapia – Cantagalli Ed. – Siena 2000
5. Gervasutti C.; Sanna A. – Le piante amiche del nostro benessere – UTET – Milano 1999
6. Mercati V.; Boncompagni E. – Fitoterapia comparata – Aboca - Sansepolcro (AR) 2000
7. Neumayer P. – Antibiotici naturali – Ed. Red – Como 2001
8. Pedretti M. – Chimica e farmacologia delle piante medicinali – Studio Ed. – Milano 2001
9. Spignoli G.; Mercati V.; Boncompagni E. – Guida bibliografica ai più noti fitoterapici – Aboca - Sansepolcro (AR) 1999
10. Valnet J., Duraffourd C., Lapraz J.C. - Phitotherapie et aromotherapie. Press de la Renaissance, Paris, 1978

VALUTAZIONE FISICA E SENSORIALE DELLA CARNE DEL POLLO “A COLLO NUDO” CONFRONTO TRA DUE DIVERSE METODICHE DI INDAGINE REOLOGICA

D. DA ROS¹, A. MARANGON²

¹Consorzio per la valorizzazione produzioni zootavicole Alta Marca Trevigiana, Colle Umberto (TV)

²Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agro Alimentari, Thiene (VI)

Parole chiave: Collo nudo, qualità della carne, lenta crescita, valutazione sensoriale, tenerezza

Physical and sensory assessment on the meat of the “naked neck” chicken: comparison of two different rheological assays

Key words: Naked neck, meat quality, slow growth, sensory assessment, tenderness

Summary: A physical and sensory assessment on the meat of the “naked neck” chicken was carried out in order to detect the most favourable age of slaughtering. Emphasis was given to physical appraisal using two different methods of investigation.

Correspondence: Diego Da Ros – Consorzio per la valorizzazione dei prodotti zootavicoli dell’Alta Marca Trevigiana – via Trento 64 – Colle Umberto (TV). Email Diego.daros@mangimicoop.it

Introduzione

I criteri di qualità ai quali il consumatore è più sensibile sono le caratteristiche organolettiche che percepisce direttamente al momento di consumare l’alimento. Nel caso della carne le principali caratteristiche sono: tenerezza, succosità e gusto, o, per la precisione, l’insieme di gusto ed odore. La consistenza del muscolo è influenzata dal tenore e dalla qualità del collagene al suo interno; il gusto sembra correlato ai lipidi corporei ed alla maturità sessuale. Queste caratteristiche tendono a variare con la velocità di crescita e l’età di macellazione dell’animale. La percezione della tenerezza e quindi della consistenza della carne non si presenta negli stessi termini in tutti i compartimenti. Nel caso della carne bovina in generale dal consumatore è ricercata la più grande tenerezza. Per il pollo invece, sembra che una carne troppo tenera non sia particolarmente apprezzata, al contrario una consistenza superiore della carne è considerata un criterio di qualità. Il pollo “Label”, avente un’età di macellazione superiore a 82 giorni, a lenta crescita, alimentato con almeno il 75% di cereali e con un limite di grassi nel mangime, allevato ad una densità non superiore a 11 capi/mq con la possibilità di 2 mq/capo di parchetti esterni dopo le 6 settimane, è ritenuto avere uno “score” organolettico superiore al broiler standard (1). I primi studi dell’INRA hanno utilizzato linee portanti il gene nanismo “dw” che oltre a caratteristiche di lenta crescita presentano combinazioni di geni determinanti il colore del piumaggio (nero, rosso e bianco) trasmissibili attraverso le linee paterne le quali apportano nella loro linea genetica anche una certa finezza della pelle e dello scheletro e minori problemi di tipo locomotorio. In particolare è stato studiato a fondo il gene dominante collo nudo “Na”. La dominanza incompleta permette lo stesso l’espressione del gene: gli animali eterozigoti presentano il collo nudo ad eccezione di un ciuffo di piume a livello craniale del collo ed un piumaggio meno denso. Gli animali sono caratterizzati dal peso del piumaggio ridotto, da una bassa percentuale di grasso addominale e sottocutaneo e da una miglior capacità di termoregolazione (2). Scopo del lavoro è valutare sul pollo a “collo nudo”, caratterizzato da una genetica e condizioni di allevamento simile al Label francese, l’età di macellazione più favorevole da un punto di vista qualitativo sulla base dell’evoluzione

delle caratteristiche fisico chimiche ed organolettiche della carne in relazione ad età, sesso e tipologia di allevamento. L’approccio sensoriale è ora pienamente riconosciuto come metodo scientifico di valutazione dell’alimento da affiancare all’analisi fisica (3). È stato inoltre approfondito lo studio delle caratteristiche fisiche confrontando due diverse metodiche di indagine reologica.

Materiali e metodi

Animali: sono stati impiegati n°1000 polli a “collo nudo” a sessi misti, ceppo T55, accasati su lettiera con una densità di 10/mq ed alimentati ad libitum con un mangime pellettato. A partire da 6 settimane 100 polli maschi sono stati trasferiti all’esterno con 4 mq/capo a disposizione. I controlli erano costituiti da petti di pollo acquistati al supermercato e femmine commerciali macellate a 42 gg. Le macellazioni sono state effettuate in azienda previa iugulazione a 68, 75, 82 e 94 gg. Di ogni soggetto veniva pesata la carcassa (comprensiva di fegato, reni, e durello), la cute, il grasso addominale, i petti e le cosce. In una seconda fase sono stati utilizzati n°2000 polli a “collo nudo” a sessi misti, ceppo T55, allevati con le stesse modalità dei precedenti e macellati a 88 gg. I petti, refrigerati a +4°C, sono stati sottoposti ad analisi.

Analisi chimica: è stata effettuata una misurazione delle proteine (UNI-ISO 937), umidità (AOAC 950.46B) e pH (a 24h, 5 e 10 gg dalla macellazione)

Analisi fisica: gli indici colorimetrici $L^*a^*b^*$ sono stati determinati con uno spettrofotometro attraverso la media di tre letture consecutive; una valutazione reologica sui petti di pollo crudi e cotti è stata condotta mediante un dinamometro universale Instron mod. 4301 equipaggiato con una cella di carico di 5 kN ed una sonda cilindrica a 5 lame radiali del diametro di 10 mm e con una velocità di penetrazione di 200 mm/min (Figura 1). Per ogni petto sono state svolte almeno tre repliche consecutive del test di penetrazione. I petti utilizzati nella seconda fase sono stati sottoposti anche ad un test di resistenza al taglio utilizzando una lama Warner-Blatzer in grado di tagliare provini cilindrici di 10 mm di diametro con una velocità di 200 mm/min. I parametri valutati nell’indagine reologica sono ricavati dalla curva di carico relativa al comportamento dei campioni sottoposti ad analisi (carico in Newton al punto di rottura; deformazione in mm; lavoro svolto dal dinamometro per deformare e

rompere il campione espresso in Joule (N x mm).

Analisi sensoriale: è stato determinato il profilo sensoriale (ISO 13299) e definito un metodo di cottura standardizzato dei campioni.

Elaborazione statistica: sono stati utilizzati Microsoft Excel per la raccolta dei dati ed il calcolo delle medie, SPSS Systat 10 per l'analisi della varianza (ANOVA) e Simca 8.0 (Umetrics) per l'analisi multivariata della componenti principali (PCA) sul prodotto crudo e cotto divise per età, sesso e tipologia di allevamento.

Risultati

Indagini fisico chimiche e sensoriali: nessuna differenza statistica significativa è stata riscontrata sul prodotto crudo e cotto per la diversità di sesso e tipologia di allevamento. Le medie dei risultati divisi per età di macellazione sono riportati nella tabella 1. I petti di pollo, all'aumentare dell'età della macellazione, hanno mostrato una diminuzione significativa dell'umidità, una variazione della proteina a 75 giorni e un sensibile incremento del peso dopo 82 giorni. Si può notare una brusca diminuzione della tenerezza, della masticabilità e della solubilità ed un aumento dell'adesività tra 82 giorni e 94 giorni, anche se non si notano particolari andamenti per la resistenza al taglio e la compattezza. Il grado di deformazione dei campioni, indice dell'elasticità delle fibre, diminuisce all'aumentare dell'età di macellazione mentre aumenta il carico e l'energia necessaria per la penetrazione dei campioni, sia per i petti crudi che per quelli cotti. Dopo gli 82 gg si può notare un brusco innalzamento di questi parametri. I valori sono sempre superiori nelle tesi rispetto ai controlli nelle varie classi di macellazione; inoltre il Δ del carico tra crudo e cotto è meno elevato nei controlli, indice di una certa durezza della carne dopo la cottura. La consistenza della carne e la sua tenerezza dopo cotta sono correlate con l'aumento con l'età del tenore in collagene e con la stabilità termica dello stesso, il quale, gelatinizzando, influenza le perdite di cottura, minime nel "Label", valorizzandone la tenerezza. Le variazioni nelle caratteristiche sia sensoriali che fisiche ci portano a considerare favorevoli le condizioni di allevamento del pollo a "collo nudo" e quindi di animali tipo "Label" fino a 82 gg di età e non oltre per evitare una brusca diminuzione di parametri importanti nella definizione di preferenza da parte del consumatore.

Il confronto nella II^a Fase tra i due metodi di indagine reologica ha confermato per la prova di penetrazione i valori della prima parte della sperimentazione; la prova al taglio ha registrato valori inferiori, legati alla minore resistenza offerta dal campione in riferimento al taglio trasversale operato da una lama "a ghigliottina". L'analisi della varianza rivela che il carico alla rottura e

Tabella 1: Medie dei risultati delle indagini fisiche, chimiche e sensoriali alle diverse età di macellazione

Table 1: Average results of the investigations (physical, chemical and sensorial) conducted on the different age of slaughtering

Tesi (gg)	Int. odore(*)	Int. aroma	Tene rezza	Succo sità	Adesività (*)	Masti cabilità	Solubilità	Res. Taglio (*)	Compat tezza (*)	Umidità (*)	Proteine (*)	Peso (*)	pH 24 h	pH 5 gg	pH 10gg	Crudo			Cotto			L* (*)	a*	b*
																Def (mm)	Caric o (N)	E (J)	Def (mm)	Caric o (N)	E (J)			
68	5,6 ^a	5,02	5,5	4,7	3,76 ^a	4,03	3,48	5,32 ^a	4,94 ^a	74,52 ^a	24,76 ^a	226,2 ^a	5,71	5,78	5,72	39,3	22,1	0,26	34,2	10,2	0,15	57,50 ^a	1,03	16,4
75	5,11 ^b	4,74	5,73	4,49	3,65 ^a	4,3	3,52	4,39 ^b	4,6 ^b	73,99 ^a	25,61 ^b	235,0 ^a	5,71	5,73	5,77	35,9	22,4	0,27	32,1	13,8	0,25	53,86 ^b	1,11	13,1
82	5,26 ^b	4,78	6,32	4,93	3,79 ^a	4,91	4,53	4,08 ^b	4,44 ^b	74,20 ^a	25,04 ^a	265,6 ^a	5,72	5,75	5,73	35,8	23,3	0,3	32,9	13,8	0,24	55,57 ^b	1	11,6
94	5,18 ^b	4,56	5,06	4,48	4,45 ^b	3,86	3,69	3,73 ^b	4,19 ^b	73,31 ^b	24,62 ^a	312,0 ^b	5,74	5,73	5,77	34,4	27,2	0,34	32,6	15,9	0,29	58,81 ^a	0,28	12,2

Legenda: (*) differenza statistica significativa p<0,05; a,b,...divisione in categorie secondo la t di Student

l'energia sono fattori discriminanti per la distinzione dei petti di pollo in oggetto, in particolar modo per le prove di penetrazione. Una prima valutazione della dispersione dei dati riferiti alle due metodiche e divisi per prodotti crudi e cotti è stata ottenuta attraverso l'analisi multivariata delle componenti principali (PCA). Sulla carne cruda si nota la differenziazione dei campioni femmine (F) e maschi (M) maggiore utilizzando la penetrazione (Fig 2) rispetto al taglio, a conferma del potere discriminante dimostrato con i risultati dell'analisi della varianza. La cottura sembra attenuare totalmente le diversità tra i campioni. Le prove di penetrazione sono quindi più efficaci nel far risaltare le diversità esistenti tra i campioni e sono quindi più indicate come metodo di valutazione del prodotto al fine di valorizzarlo e soprattutto differenziarlo da un punto di vista qualitativo.

Bibliografia

1. Sauveur B. (1997) "Les critères et facteurs de la qualité des poulets Label Rouge". INRA Prod.Anim. 10, 219-226.
2. Monnet L.B., Bordas et al. (1980) "Gene cou nu, poids corporel et paramètres atomiques et physiologiques des poulettes et des poules adultes selon la température". Ann. Génèt Sèl .Anim. 12, 241-254.
3. Cook G.L., Homer D.B. (1996) "The effect of number of sensory assesment on the accuracy of treatment comparisons in meat quality trials". Food Qual. Pref. 7, 95-99.

Figure 1: Dinamometro Instron: prova di penetrazione

Figure 1: Dynamometer Instron: penetration test

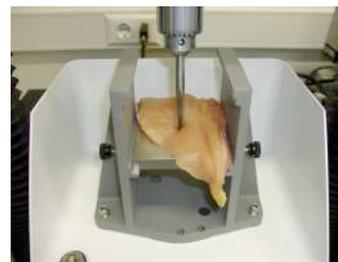
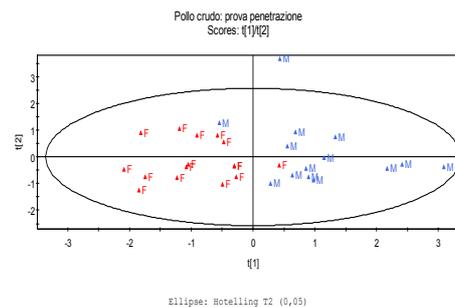


Figure 2: PCA: prova di penetrazione

Figure 2: PCA: penetration test



DIAGNOSI DI MALATTIE ENTERICHE VIRALI NEL TACCHINO MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA ED IDENTIFICAZIONE DI CORONAVIRUS IN UN CASO DI ENTERITE

A. MORENO MARTIN¹, L.J. VINCO², P. CORDIOLI¹, A. LAVAZZA¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia*

²*Gruppo Bignami S.p.A. Produzioni Avicole, Anzola dell'Emilia (Bologna)*

Parole chiave: tacchino, virus, microscopia elettronica, diagnosi, enterite, coronavirus

Diagnosis of turkey viral enteric diseases by electron microscopy and identification of coronavirus in a case of turkey enteritis

Key words: turkey, diagnosis, virus, coronavirus, electron microscopy, enteritis

Summary: The negative staining electron microscopy techniques are widely used at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) in Brescia as diagnostic tools to detect viral infections of all animal species. In the EM Laboratory of the IZSLER around 3000 samples are examined each year and around 25-30% are from avian species. The most common methods used are the Airfuge techniques based on the use of Beckman Airfuge. In this paper we firstly estimate the prevalence of different viruses, identified by negative contrast electron microscopy, on faecal and gut samples taken from 1-5 week old turkeys suffering from enteric diseases, summarising the activity of the laboratory during the period 1994-2001 (260 samples). By EM we observed the presence of viral particles in 51,2% of the samples examined; rotavirus was identified in 26.3%, astrovirus in 23.1%, enterovirus-like in 10.0%. The second goal of this work is to report the identification of a Coronavirus, probably for the first time in Italy, from the intestinal contents of 82 day-old commercial turkeys during an outbreak of enteritis occurred in January 2000. In conclusion we summarise the advantages and disadvantages of negative staining EM and discuss the cause of false negative results when used to diagnose viral diseases of turkeys.

Correspondence: Antonio Lavazza, Lab. Electron Microscopy, IZSLER, Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia (Italy). Tel. +39 30 2290298 Fax +3930 2425251 email: alavazza@bs.izs.it

Introduzione

Le tecniche di microscopia elettronica in colorazione negativa sono impiegate come strumenti diagnostici di identificazione di virus in tutte le specie animali. La ME consente di effettuare rapidamente una diagnosi quando la malattia è sostenuta da virus non coltivabili, identificare infezioni virali multiple o virioni non replicabili (immunocomplessati). In medicina veterinaria rende anche possibile fare diagnosi quando nessun'altra metodica è disponibile, e ciò è spesso la regola per alcune specie "minori" o specie selvatiche come pure per alcune malattie avicole meno comuni (2,3,5). Nel laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia vengono esaminati circa 3000 campioni ogni anno e circa il 25-30% di questi provengono da specie avicole. Le tecniche più comunemente usate che comprendono anche la immunoelettromicroscopia e l'immuno-gold sono basate sull'utilizzo dell'ultracentrifuga Beckman Airfuge. Questi metodi dimostrano un buon grado di sensibilità (limite di detectabilità = 10⁴ particelle/ml) paragonabile ad un test in ELISA.

Materiali e Metodi

Campioni: Durante il periodo 1994-2001, 260 campioni intestinali e fecali originati da focolai di enterite in tacchini commerciali verificatisi principalmente in allevamenti del Nord Italia sono stati conferiti al laboratorio di Microscopia elettronica dell'IZSLER di Brescia. Gli animali conferiti avevano un'età compresa tra 1 e 5 settimane e presentavano sintomatologia enterica caratterizzata principalmente da ritardata crescita, depressione, feci molli e/o diarrea. Nel Gennaio 2000 all'IZSLER di Brescia sono stati conferiti per analisi virologica campioni di contenuto cecale ed intestinale di tacchini commerciali di 82 giorni di età. Gli animali provenivano da un allevamento di 8000 capi di età unica situato nel nord Italia ed apparivano depressi, anoressici con perdita di peso e feci molli, ma la mortalità era del tutto trascurabile. I sintomi clinici perdurarono per circa 4 settimane e la perdita di peso iniziale non venne più recuperata. Al carico gli

animali erano sottopeso di 1,5 kg e l'indice di conversione 2,8 cioè 0,3-0,4 punti superiori alla media del periodo. I tratti intestinali erano pallidi, dilatati con contenuto mucoso ed alimento parzialmente indigerito. La lettiera era difficilmente gestibile come conseguenza della diarrea.

Microscopia elettronica: I campioni sono stati allestiti utilizzando la metodica Airfuge comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia (4) ed esaminati con un TEM Philips CM10, operante a 80kV. L'identificazione delle particelle virali, osservate ad ingrandimenti compresi fra 15500 e 39000x, era eseguita sulla base delle caratteristiche morfologiche tipiche dei virioni. L'esame di immuno-elettromicroscopia (IEM) era eseguito su tutti i campioni. Il metodo consisteva nell'incubare il campione con un pool di sieri, provenienti da tacchini convalescenti, prelevati 20 gg dopo un episodio clinico di enterite causato da rota e astrovirus. Per l'identificazione del coronavirus del tacchino si è utilizzato lo stesso metodo impiegando un siero specifico iperimmune, fornito dal Prof Y.M. Saif (Ohio, USA).

Risultati

Tramite EM e IEM si è visto la presenza di particelle virali nel 51,2% dei campioni esaminati; rotavirus è stato identificato nel 26,3%, astrovirus nel 23,1%, enterovirus-like nel 10,0%. Sporadicamente è stata riscontrata anche la presenza di parvovirus-like, adenovirus e rod-shaped virus-like particules (RSVLP). I dati completi vengono riportati in tabella 1. La positività media risultava 51,2%. Il range di positività andava da 14,2 e 90,9% ed anche negli ultimi quattro anni, quando si è avuto un sensibile incremento di conferimenti, è stata riscontrata una positività virale sempre leggermente superiore al 50%. Si è spesso osservata (41 casi) la contemporanea presenza nello stesso campione di due diversi virus in associazione. L'associazione rotavirus più astrovirus era l'associazione riscontrata con maggior frequenza (31 casi), sottolineando il loro ruolo patogeno e la loro

importanza quali agenti primari di enterite (Tabella 2). Il secondo obiettivo di questa presentazione è di segnalare la identificazione di coronavirus probabilmente per la prima volta in Italia, in contenuti intestinali di tacchini commerciali di 82 giorni di età durante un caso di enterite occorsa nel gennaio 2000. L'indagine di ME dei contenuti intestinali, raccolti dagli animali con sintomatologia clinica, ha rivelato la presenza di particelle virali con morfologia tipica dei coronavirus. La immunoelettromicroscopia condotta impiegando un antisiero policlonale positivo nei riguardi dei coronavirus ha rivelato la presenza di aggregati di particelle virali confermando così la presenza di coronavirus (Figura 1).

Discussione

La ME in colorazione negativa è un valido aiuto nella diagnosi di malattie enteriche virali del tacchino. Potrebbe essere consigliato particolarmente quando non siano disponibili o impiegabili metodi standard di diagnosi virale. In particolare la microscopia elettronica diretta e la immunoelettromicroscopia sono particolarmente utili per diagnosi rapide fornendo la possibilità di avere una risposta in 3-4 ore. L'indagine condotta con diagnosi in ME ha sottolineato un'alta prevalenza di virus in animali di 1-5 settimane di età con enterite (oltre il 50%) ed ha confermato l'importanza ed il ruolo primario di rotavirus e astrovirus. Come già descritto da vari autori (7) sono stati rinvenuti spesso in associazione cioè 31 volte che corrisponde ad oltre il 50% delle positività per ognuno dei 2 virus. Questo risultato indica un effetto sinergico nel causare enterite nei tacchinotti. Sporadicamente abbiamo rilevato piccoli virus (parvovirus-like o circovirus-like), ma sono necessari ulteriori studi per poter chiarire la natura ed il ruolo patogeno di questi virus. L'enterite da coronavirus è una malattia acuta altamente contagiosa dei tacchini di tutte le età, particolarmente di animali giovani. Per molti anni il

coronavirus del tacchino è stato isolato solo negli Stati Uniti e successivamente anche in Canada (6), paesi in cui causa gravi danni economici all'industria avicola, legati principalmente alla mancata uniformità del gruppo ed al peggioramento dell'indice di conversione. Recentemente in GB è stata descritta l'identificazione di un coronavirus nel contenuto intestinale di tacchinotti, che rappresenta la prima descrizione di un caso di coronavirus in tacchini in Europa (1). In Italia sebbene la sua presenza sia già stata sospettata in precedenza (4 casi dubbi nel 1999), questa è la prima identificazione confermata dell'agente eziologico.

Bibliografia

1. Cavanagh D., Mawditt K., Sharma M., Drury S.E., Ainsworth H.L., Britton P., Gough R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology*, 30, 355-368.
2. Gibbs E.P.J., Smale C.J., Voyle C.A., (1980). Electron Microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. *Veterinary Record*, 106, 451-458.
3. Gough R.E., Alexander D.J., Collins M.S., Lister S.A., Cox W.J. (1988). Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. *Avian Pathology*, 17, 893-907.
4. Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D: (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet Rec*, 126: 581
5. Mc Nulty M.S., Curran W.D., Todd D., Mc Nulty J.B. (1979). Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. *Avian Pathology*, 8, 239-247.
6. Nagaraya K.V. & Pomeroy B.S. (1997) Coronaviral Enteritis of turkeys (Bluecomb Disease). In Barnes H.J. Chapter 27, Viral Enteric infections. In B.W. Calnek, (Ed.), *Diseases of Poultry* 10th edn (pp. 686-692). Ames: Iowa State University Press.
7. Reynolds D.L. (1997). Astrovirus Infections. In Barnes H.J. Chapter 27, Viral Enteric infections. In B.W. Calnek, (Ed.), *Diseases of Poultry* 10th edn (pp. 701 -705). Ames: Iowa State University Press.

Tabella 1: Distribuzione della positività virale per anno e tipo di virus

Table 1: Distribution of viral positivity for year and type of virus

Anno	N°	Negativo	Rotav.	Astrov.	Enterolike	Parvolike	Adenov.	RPSLV	Coronav.	Ass.								
1994	14	12	85.8	1	7.1	0	0	1	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	11	1	9.1	3	27.3	4	36.4	3	27.3	2	18.2	0	0	0	0	0	0	2
1996	7	1	14.3	0	0	3	42.8	3	42.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	26	17	65.4	7	26.9	2	7.7	2	7.7	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1998	49	28	57.1	10	20.4	16	32.6	3	6.1	1	2.0	0	0	0	0	0	0	9
1999	48	23	47.9	11	20.1	13	27.1	2	4.1	0	0	2	4.1	0	0	4	8.3	7
2000	41	19	46.3	14	34.1	10	24.4	0	0	4	9.7	1	2.4	2	4.9	1	2.4	9
2001	64	26	40.6	22	34.4	14	21.8	12	18.7	2	3.1	0	0	0	0	0	0	12
Total	260	127	48.8	68	26.2	62	23.1	26	10.0	9	3.4	3	1.1	2	0.7	5	1.9	41

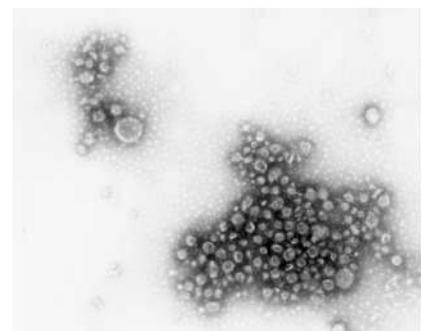
Tabella 2: Infezioni multiple osservate alla ME

Table 2: Multiples infections observed at EM

Tipo di associazione	94	95	96	97	98	99	00	01	Tot.
Rota + Astro				1	7	7	6	10	31
Rota + Enterolike		2		1	1		1	1	6
Rota + Parvolike							1		1
Astro + Parvolike								1	1
Enterolike + Parvolike					1				1
Adeno + Parvolike							1		1
Totale	0	2	0	2	9	7	9	12	41

Figura 1: Particelle di coronavirus immunoaggragate mediante l'utilizzo di antisiero policlonale specifico.

Figure 1: Coronavirus particles immunoaggregated using a polyclonal specific antiserum.



COMUNICAZIONE 14

RACCOLTA, TRASPORTO E STOCCAGGIO DELLE SPOGLIE AVICOLE

F. COMENCINI

Az. ULSS 21 *Legnago*(VR)

Parole chiave: contenitori, raccolta, trasporto, stoccaggio, spoglie avicole.

Collection, transport and stocking of poultry carcasses

Key words: containers, collection, transport, stocking, poultry carcasses

Summary: Legislation references concerning collection, transport and stocking of high risk materials are the following: D.L.vo 508/92, D.M. 26/03/94, Circ.Min. 19/12/94 n.25, update but at the same time still valid as far as the characteristics of the containers are concerned.

Correspondence: Flavio Comencini: Via Pace 12, 37064 Povegliano V.se (VR). E-mail f.comencini@tiscali.it

Introduzione

Il D.L.vo 508/92 conteneva già riferimenti in merito alla raccolta ed il trasporto dei rifiuti di origine animale, specificando che i contenitori ed i veicoli devono essere adeguatamente coperti per evitare dispersione di materiale.

Tuttavia è con l'emanazione del D.M. 26 marzo 94, concernente la raccolta, il trasporto e lo stoccaggio di materiali ad alto e basso rischio, da inviare agli impianti di trattamento e trasformazione, che sono state dettate precise norme in merito, meglio esplicate con la Circ.Min.n.25 del 19 dicembre 1994, soprattutto per ciò che riguarda le caratteristiche dei contenitori, l'emissione del documento di trasporto, le targhette da applicare ai contenitori, le dichiarazioni di avvenuto lavaggio e disinfezione.

Materiali e metodi

I contenitori sono dei cassoni di varie forme e dimensioni, a perfetta tenuta per quanto riguarda il loro dispositivo di chiusura ermetica, costruiti in materiale resistente (generalmente in ferro o lega di alluminio), impermeabili, facilmente lavabili e disinfettabili, adeguatamente coperti, in modo tale da evitare qualsiasi dispersione di materiale, con una capacità di circa 150/180 q.li, normalmente scarrabili e trasportabili su autocarri.

I contenitori devono essere identificati mediante una targhetta, applicata in modo inamovibile, recante il tipo di rifiuto da contenere, il numero dell'autorizzazione e la ASL che l'ha rilasciata; devono essere autorizzati dal Servizio Veterinario, che ne verifica il mantenimento dei requisiti di idoneità con cadenza annuale.

Possono essere utilizzati anche automezzi furgonati, veicoli sui quali il cassone è fisso, non scarrabile ed è parte integrante del veicolo mobile; è chiaro che questi veicoli, per poter essere autorizzati, dovranno possedere i requisiti citati poc'anzi per i contenitori.

Gli automezzi ed i contenitori utilizzati per la raccolta dei rifiuti di origine animale devono essere sottoposti, dopo ogni scarico, ad accurato lavaggio e a radicale disinfezione; le operazioni di avvenuto lavaggio e disinfezione dovranno risultare da una dichiarazione scritta, datata e firmata dal responsabile dell'impianto, che può essere riportata sul documento di trasporto.

Negli ultimi anni sono stati proposti sul mercato anche contenitori atti a refrigerare e/o congelare le spoglie animali, con la stessa capacità di quelli già citati, anche questi scarrabili e trasportabili su autocarri, di solito di proprietà delle ditte di autotrasporti e

adoperati in convenzione presso le aziende, ove rimangono generalmente fino alla fine del ciclo di allevamento venendo successivamente prelevati e sostituiti con altri lavati e disinfettati.

Le ditte di autotrasporti e/o le sardigne solitamente propongono convenzioni ai singoli allevatori o gruppi di essi, per effettuare la raccolta delle carcasse, con una cadenza che varia a seconda delle necessità legate al ciclo di allevamento.

La rimozione delle carcasse dovrà avvenire sulla scorta del già citato documento di trasporto o Allegato A, redatto in triplice copia, con l'indicazione della data, del tipo e della quantità del materiale organico prelevato, nonché della sardigna di destinazione, sottoscritto dall'allevatore e dal trasportatore; il documento dovrà poi essere vistato a cura della ditta destinataria con dichiarazione di effettivo scarico e trasformazione del materiale inviato.

Attualmente, con l'entrata in vigore del D.L.n.68 del 19 aprile 2002, tutti gli avicoli morti devono essere inviati agli impianti di trasformazione accompagnati da un certificato sanitario per il trasporto delle spoglie animali da destinare alla distruzione redatto dal veterinario ufficiale, integrato al carico dall' allegato A.

Risultati e Discussione

E' interessante menzionare una soluzione "fai da te" praticata da alcuni allevatori del nord-est della provincia di Verona alcuni anni or sono: in questa zona erano e sono tuttora funzionanti due stabilimenti ad alto rischio, per cui la maggioranza delle aziende agricole si era dotata di piccoli contenitori o piccoli cassoni, aventi una capacità che variava dai 100 ai 200 litri, con gli stessi requisiti strutturali di quelli citati in precedenza, facilmente trasportabili su qualsiasi veicolo aziendale (autocarro, furgone, trattore con muletto idraulico, rimorchio agricolo, carrello appendice, ecc.) e regolarmente autorizzati dal Servizio Veterinario.

Gli allevatori trasportavano per proprio conto le carcasse degli animali morti, senza avere la necessità di fare una convenzione con le ditte di trasporto rifiuti di origine animale, riducendo notevolmente sia i rischi sanitari legati all'entrata in azienda di veicoli sia i costi di stoccaggio e di trasporto.

Dal punto di vista epidemiologico, l'ingresso in azienda di veicoli attrezzati per la raccolta ed il trasporto delle spoglie avicole, viene identificato come momento di elevata pericolosità, poiché gli stessi veicoli possono o potrebbero frequentare più allevamenti nella stessa giornata.

La recente epizootia di influenza aviaria HPAI ha convinto tutti gli operatori del settore avicolo che è necessaria, quale misura di biosicurezza, la collocazione in tutti gli allevamenti avicoli intensivi di una o più celle di refrigerazione e/o congelamento nelle quali riporre le spoglie degli animali morti giornalmente, capienti quanto basta per poter garantire, prevedendo una mortalità fisiologica, lo stoccaggio e la conservazione delle stesse fino alla fine del ciclo di allevamento.

Si è del parere inoltre, che l'installazione di un cella di refrigerazione e/o congelamento, dovrebbe essere ritenuto un requisito indispensabile per il rilascio dell'agibilità ai nuovi insediamenti zootecnici.

Bibliografia

1. Comencini F. (2002). Problematiche connesse allo smaltimento delle spoglie avicunicole. Tesi di specializzazione. Scuola di specializzazione in tecnologia e patologia delle specie avicole, del coniglio e della selvaggina. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Milano. Relatore Prof. D. Gallazzi. 20-24

COMUNICAZIONE 15

SMALTIMENTO DELLE SPOGLIE AVICOLE: RENDERING O COMPOSTAGGIO?

F. COMENCINI

Az. ULSS 21 Legnago(VR)

Parole chiave: smaltimento, spoglie avicole, rendering, compostaggio

Disposal of poultry carcasses: rendering or composting?

Key words: disposal, poultry carcasses, rendering, composting

Summary: the intention of this paper is to contribute to the discussion that in the first few months of 2002 has involved the poultry industry mainly as far as the problems related to the disposal of on farm mortality are concerned, since the present legislation considers for high risk materials, among which animal carcasses as well, the destruction of such material as a whole or following transformation in high risk plants through incineration.

The situation that has been created has caused a heavy increase in the price of poultry carcasses disposal and it has therefore become necessary to consider the possibility of the farmers to use composting as a realistic method of carcasses disposal.

Correspondence: Flavio Comencini: Via Pace 12, 37064 Povegliano V.se(VR). E-mail: f.comencini@tiscali.it

Introduzione

L'avvento delle problematiche relative alla BSE e la conseguente esclusione delle farine di carne dall'alimentazione animale, come provvedimento prudenziale di tutela dei consumatori e del patrimonio animale, hanno creato problemi quasi insormontabili dovuti al fatto di non poter più utilizzare tali materiali nel circuito alimentare e di destinarle obbligatoriamente all'incenerimento.

Questa situazione ha spiazzato gli impianti di rendering e le industrie mangimistiche, determinando notevole disagio agli allevatori che di fatto hanno avuto un aumento considerevole dei costi per lo smaltimento delle spoglie avicole.

Nell'ultimo decennio gli stessi allevatori, con l'aiuto dei veterinari pubblici, aziendali e liberi-professionisti, avevano preso coscienza delle problematiche connesse agli smaltimenti fraudolenti delle spoglie avicole, evitando quindi di danneggiare l'ambiente e utilizzando il più possibile la strada della trasformazione dei rifiuti di origine animale attraverso gli impianti di rendering, favoriti anche dal fatto che, fino al momento del bando delle farine di carne ed ossa dal circuito alimentare, la cessione delle carcasse degli avicoli morti in azienda avveniva con costi minimi.

In questi ultimi mesi le problematiche legate allo smaltimento delle spoglie animali hanno assunto dimensioni assai preoccupanti, proprio in considerazione delle alte percentuali di mortalità durante il ciclo di allevamento, dell'esiguo numero di impianti di incenerimento presenti sul territorio italiano, dislocati per lo più al Nord, e infine, dei costi elevati legati alla distruzione.

Il rischio è quindi di vanificare quanto di buono è stato fatto in passato e si rende necessario se non addirittura urgente trovare la strada per attuare lo smaltimento delle spoglie avicole attraverso, l'utilizzo di sistemi di compostaggio, visto che tali tecniche possono essere considerate delle eccellenti alternative soprattutto per quanto riguarda la sicurezza per l'ambiente, le garanzie sanitarie e l'economicità del processo.

Materiali e metodi

Da oltre un decennio negli USA, il compostaggio è una tecnica di smaltimento delle carcasse avicole largamente utilizzata, legalmente ammessa, incentivata.

Attualmente è oggetto di valutazione da parte delle autorità veterinarie italiane.

La recente epizootia di influenza aviaria HPAI che ha interessato il Nord Italia, ha creato enormi problemi in merito allo smaltimento delle spoglie degli animali venuti a morte od abbattuti e nello stesso tempo ha sensibilizzato le autorità veterinarie nazionali e regionali riguardo il compostaggio che fino ad oggi è sempre stato visto con grosse perplessità in quanto mai normato.

La Regione Lombardia aveva autorizzato il compostaggio per lo smaltimento delle carcasse degli avicoli venuti a morte o abbattuti, utilizzando la lettiera degli stessi allevamenti sedi di focolaio, così come previsto al punto 6, comma 2, del Manuale operativo in caso di influenza aviaria.

La Regione Veneto con il Decreto n.263 del 27/04/2000, che autorizzava gli accasamenti dei volatili nelle aree soggette a depopolamento, introduceva la possibilità da parte del Servizio

Veterinario competente per territorio di autorizzare l'uso di sistemi di compostaggio per lo smaltimento in loco dei volatili morti e della lettiera.

Riferendosi però alla diffidenza verso questo sistema da parte delle autorità, è dello scorso anno la richiesta di alcuni allevatori avicoli della provincia di Vicenza al Servizio Veterinario della Regione Veneto per ottenere l'autorizzazione all'uso di sistemi di compostaggio: la richiesta è stata girata al Ministero della Salute e la risposta è stata quella di autorizzarli con il vincolo che il prodotto ottenuto non possa essere usato come ammendante ma debba essere avviato, necessariamente, all'incenerimento.

Negli USA è stato dimostrato che con questa tecnica di smaltimento, la normale mortalità può essere gestita efficacemente ed in sicurezza; può rappresentare un sistema sicuro per l'ambiente e dà notevoli garanzie sanitarie a livello di allevamento in quanto si possono smaltire le spoglie avicole senza far entrare in azienda veicoli per il trasporto delle stesse agli impianti di rendering, ma soprattutto ha dei bassi costi per la costruzione delle strutture e per il mantenimento del processo.

Può essere considerato un metodo alternativo in quanto richiama la pratica abitualmente utilizzata in agricoltura, con la quale gli scarti organici decomponibili vengono utilizzati come sorgenti di energia e di cibo da alcuni microrganismi, che li trasformano in un prodotto finale utile come ammendante.

È un processo di decomposizione biologico che converte materiale organico con potenziali problemi di odori ed altri inconvenienti in un prodotto stabile, ragionevolmente libero da odori, non facilita il processo procreativo di mosche ed altri insetti, inoltre, fa sì che il peso del prodotto compostato sia minore dell'originale immesso, perché la decomposizione converte molti dei materiali carbonacei in biossido di carbonio.

Le proprietà fisiche e chimiche degli elementi che entrano nel processo (lettiera, volatili, paglia, ecc.) incidono sul tasso di compostaggio, inoltre il volume e la superficie del materiale organico che dovrà essere decomposto influenzano il tipo di microrganismo coinvolto ed il grado di attività biologica del processo; per queste ragioni, piccole carcasse sono più facilmente compostabili di quelle grandi o comunque di grosse quantità di spoglie avicole.

Il contenuto di umidità può determinare il comportamento del processo, che può essere aerobico o anaerobico; per lo smaltimento dei volatili morti, i sistemi aerobici sono preferibili perché sono più veloci e producono meno odori ed altri inconvenienti; l'umidità ideale per un buon compostaggio aerobico si aggira intorno al 50-60%.

La tecnica consiste nel miscelare paglia o truciolo (fonti di carbonio), spoglie avicole e lettiera (fonti di azoto) ed eventualmente acqua (per raggiungere le adeguate umidità); la miscela deve avere un rapporto Carbonio/Azoto variabile da 15:1 a 35:1.

Quando tutti questi materiali vengono tra loro miscelati, per azione dei microrganismi aerobici presenti, inizia un naturale processo di fermentazione, che porta a raggiungere, dopo due o tre giorni, temperature superiori ai 60°C; la temperatura è un buon indicatore di attività biologica nella pila del composto ed è facilmente misurabile; il contenuto di

umidità, la disponibilità di ossigeno e l'attività microbiologica, sono influenzati dalla temperatura.

La temperatura all'interno del composto inizia a salire fino a raggiungere dopo qualche giorno un picco e poi inizia a decrescere nel giro di 7-10 giorni, segno che il composto ha bisogno di ossigeno e quindi, per continuare l'attività batterica, il materiale dovrà essere smosso e successivamente si vedrà che la temperatura ritornerà a salire; questo processo di movimentazione, deve essere continuato fino a che la reazione alla risposta non avviene più, indicando che il materiale ottenuto è biologicamente stabile.

L'intero processo richiede mediamente circa 60-70 giorni ed in tale modo polli e tacchini interi, eccetto per alcuni frammenti di ossa e penne, vengono completamente degradati in un prodotto finale pronto per essere usato come ammendante ad uso agricolo o dopo vagliatura nelle aziende florovivaistiche.

La struttura di contenimento per eseguire il compostaggio è rappresentata da celle rettangolari, tipo box o cassone, delimitate da aste di legno tra loro collegate ma distanziate tra loro di almeno 5 cm per consentire una adeguata ventilazione, con un lato aperto per poter permettere all'operatore l'accesso per la movimentazione dei materiali; sarebbe opportuno che tali strutture fossero coperte da un tetto per riparare il materiale soprattutto dalla pioggia che può dare problemi ai fini della corretta gestione della massa e che fossero dotate di un pavimento di cemento, quest'ultimo raccomandabile sia per le operazioni di manipolazione del compost sia per evitare la contaminazione del suolo e del sottosuolo.

All'interno di tale struttura si dispongono a strati i materiali citati precedentemente: lo strato inferiore (basale) è costituito da lettiera rappresa o di vecchia data con uno spessore di circa 15 cm, sul quale si sovrappone un altro strato di circa 5 cm di paglia o truciolo e, subito al di sopra, uno strato di carcasse ricoperto da lettiera che rappresenta la base di un secondo ciclo.

Per il successo dell'operazione, la struttura deve essere adeguatamente caricata; inoltre un accorgimento importante è quello di mantenere le carcasse a una distanza di almeno 5 cm dalle strutture di contenimento per favorire la ventilazione all'interno della struttura stessa e per favorire l'azione dei microrganismi aerobici.

A seconda delle dimensioni dell'allevamento, della tipologia di animali da allevare e quindi delle percentuali di mortalità, potranno essere previste più strutture di compostaggio, protette dal vento e dalla pioggia o, meglio, localizzate in ambiente chiuso e/o protetto.

Risultati e discussione

Perché il compostaggio possa essere considerato un metodo valido per eliminare le carcasse avicole, è di capitale importanza che il processo esiti nella distruzione dei microrganismi patogeni prima che il prodotto finale sia sparso sui terreni.

Dalla bibliografia consultata sono state condotte prove di campo ed indagini per valutare la sicurezza microbiologica del processo e si evince che un buon compostatore, se ben gestito, genera temperature capaci di distruggere molti agenti, patogeni per gli uccelli e per l'uomo, che potrebbero eventualmente essere presenti nelle spoglie avicole.

Il compostaggio potrebbe essere praticabile per cicli di breve durata come i polli da carne e con qualche accorgimento anche i tacchini da carne, ma è difficilmente attuabile o non lo è affatto per cicli di lunga durata come i riproduttori, le ovaiole e le mortalità eccezionali come nel caso di soffocamento o epizootie.

In alternativa a questi compostatori è possibile utilizzare una tecnica di compostaggio artigianale che moltissimi allevatori avicoli hanno sempre utilizzato per risparmiare sui costi di smaltimento, ovvero quella di mescolare alla lettiera del ciclo precedente stoccata in azienda, le carcasse degli animali morti durante il ciclo in corso; la tecnica consiste nel mescolare e rivoltare la massa ottenuta ogni 15-20 giorni a seconda della stagione, con il risultato che, dopo circa 40-60 giorni per i broiler e circa 90-120 giorni per i tacchini, si ottiene un compost con l'eventuale presenza di alcuni frammenti di ossa.

Per l'eliminazione delle spoglie avicole, il compostaggio potrebbe rappresentare quindi un sistema alternativo, economico, sicuro per l'ambiente ma, soprattutto, una garanzia sanitaria a livello di allevamento in quanto si potrebbero smaltire le carcasse senza far entrare in azienda veicoli attrezzati per la raccolta ed il trasporto delle stesse, dato che, dal punto di vista epidemiologico, quest'ultimo viene

identificato come momento di elevata pericolosità, perché i veicoli possono o potrebbero frequentare più allevamenti nella stessa giornata.

Purtroppo però, stante l'attuale normativa che prevede la trasformazione obbligatoria delle spoglie avicole in impianti di rendering, la soluzione di adottare il compostaggio quale tecnica di smaltimento non è ancora praticabile.

La situazione troverà una soluzione con l'emanazione del Regolamento sulla raccolta, trasporto, stoccaggio e utilizzazione dei sottoprodotti di origine animale da parte del Parlamento Europeo, che verrà pubblicato, con ogni probabilità entro la fine dell'anno ed entrerà in vigore entro il primo semestre 2003.

Con tale Regolamento, che prevede 3 Categorie di utilizzo dei sottoprodotti, sarà allargata la lista di utilizzo dei materiali ad alto rischio, prevedendo il compostaggio come tecnica da utilizzare per lo smaltimento delle spoglie avicole.

Bibliografia

1. Comencini F. (2002). Problematiche connesse allo smaltimento delle spoglie avicunicole. Tesi di specializzazione. Scuola di specializzazione in tecnologia e patologia delle specie avicole, del coniglio e della selvaggina. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Milano. Relatore Prof. D. Gallazzi. 39-45.

COMUNICAZIONE 16

INDAGINE SULLA PRESENZA DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (PBF) IN PAPPAGALLI D'IMPORTAZIONE

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 d'importazione, polymerase chain reaction

Survey on the incidence of Psittacine Beak and Feather Disease in imported psittacine birds

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

Summary: The presence of Psittacine Beak and Feather Disease (PBF) in imported psittacine birds has been evaluated. Parrots derived from 5 different aviaries and 3 different importation stations have been tested. The diagnosis was performed using a PCR assay, which had been optimized, in our laboratory. PBF was found in 7 (3%) of the 231 birds tested. This percentage is lower than that found in the Italian psittacine aviaries.

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 virale ad andamento acuto nei soggetti giovani e cronico negli adulti. Determina distrofia e perdita delle penne, accrescimento abnorme del becco con fratture e necrosi del palato. L'esito della malattia è quasi sempre infausto a causa dell'azione immunosoppressiva del virus (3,6). Il virus è stato identificato in Australia nel 1984 (4). Attualmente si conosce la diffusione di questa patologia nelle popolazioni selvatiche di cacatua, roselle, ondulati e lori in Australia (5). La percentuale di soggetti positivi in queste popolazioni può andare dal 20% al 75%. È stata segnalata anche in popolazioni selvatiche di cacatua nelle Molucche e nelle Filippine e si presume sia diffusa in tutta l'Indonesia (6). A causa dell'intenso commercio di pappagalli, la PBF si è diffusa in tutti i continenti ed è segnalata in oltre 40 specie di pappagalli allevati in Europa, Stati Uniti e Asia (3). In una stazione d'importazione di uccelli, negli USA, venne rilevato lo 0,5% di cacatua positivi alla PBF. Non vi sono ancora segnalazioni di soggetti positivi alla malattia in popolazioni selvatiche del Centro e Sud America(3).

Vista la presenza della PBF in pappagalli presenti in Italia (1) abbiamo voluto, con questa indagine, verificare quanto l'importazione di pappagalli possa contribuire alla diffusione della malattia.

Materiali e metodi

Uccelli. Venivano testati 231 pappagalli provenienti da tre centri di importazione e tre allevamenti. I pappagalli importati provenivano sia da paesi europei (Belgio, Olanda e Germania), sia da paesi extraeuropei, raggruppati in due grosse categorie, definite Nuovo Mondo (Paesi del Centro e Sud America) e Vecchio Mondo (Paesi dell'Africa, dell'Asia e dell'Oceania). Nei centri di importazione si trovavano uccelli di recente importazione, mentre negli allevamenti venivano analizzati i soggetti adulti importati negli ultimi cinque anni.

Campioni. Ad ogni pappagallo 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 dal sangue intero,

utilizzando il *Wizard genomic DNA purification kit* (*Promega-USA*). Per l'amplificazione venivano utilizzati i primers pubblicati da Ypelaar (5). Primer sense: AACCCTACAGACGGCGAG, 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

I 231 pappagalli esaminati appartenevano a differenti generi, come descritto nelle Tabelle 1-3. Di questi, 73 provenivano da paesi dell'Unione Europea (Tabella 1); 158 provenivano da paesi extraeuropei, così suddivisi: 89 (56%) importati dai paesi del Nuovo Mondo (Tabella2) e 69 (44%) da paesi del Vecchio Mondo (Tabella 3).

Tabella 1: Pappagalli importati da Paesi UE (Belgio, Olanda, Germania)

Table 1: *Psittacine birds imported from UE Countries (Belgium, The Netherlands and Germany)*

Genere	N° soggetti
<i>Eclectus</i>	7
<i>Psittacus</i>	35
<i>Poycephalus</i>	6
<i>Amazona</i>	14
<i>Agapornis</i>	1
<i>Psittacula</i>	4
<i>Ara</i>	6
Totale	73

Tabella 2: Pappagalli importati dal Nuovo Mondo

Table 2: *Psittacine birds imported from New World*

Paese	N° soggetti	Genere
Argentina	7	<i>Amazona</i>
Guatemala	9	<i>Ara, Deroptyus</i>
Guyana	5	<i>Amazona</i>
Nicaragua	9	<i>Amazona, Pionus</i>
Suriname	59	<i>Amazona, Ara, Pionus</i>
Totale	89	

Tabella 3: Pappagalli importati dal Vecchio Mondo
Table 3: *Psittacine birds imported from Old World*

Paese	N° soggetti	Genere
Camerun	19	<i>Psittacus</i>
Guinea Equat.	5	<i>Psittacula</i>
Hong Kong	10	<i>Melopsittacus</i>
Indonesia	27	<i>Cacatua, Eolophus, Thricoglossus</i>
Nuova Zelanda	2	<i>Cacatua</i>
Pakistan	3	<i>Psittacula</i>
Papua Nuova Guinea	2	<i>Cacatua</i>
Taiwan	1	<i>Nymphicus</i>
Totale	69	

Sul totale degli uccelli esaminati, 7 (3%) risultava positivo alla PBFDF (tab.4). Valutando l'origine dei soggetti esaminati, si rileva che sui 73 pappagalli provenienti dai paesi UE, 5 (il 6,85%) erano positivi. Nessun soggetto positivo si evidenziava tra i pappagalli importati dalle nazioni del Nuovo Mondo, mentre tra quelli del Vecchio Mondo, 2 (2,9%) avevano la PBFDF.

Tabella 4: Genere e provenienza dei soggetti positivi
Table 4: *Genus and origin of positive birds*

Provenienza	N° soggetti	Genere
UE (Belgio)	5	<i>Psittacus</i>
Indonesia	1	<i>Eolophus</i>
Papua Nuova Guinea	1	<i>Cacatua</i>
Totale	7	

I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli rilevati in un precedente lavoro, che riguardava la presenza della PBFDF in pappagalli allevati in Italia (1) (Tab.5). La minore incidenza di positivi alla PBFDF nei pappagalli importati (3%) rispetto a quelli allevati (7%) in Italia è risultata significativa (test χ^2 4,04; g.l.=1 p=0.044)

Tabella 5: Importazione e allevamento: positivi
Table 5: *Importation and farming: positives*

Soggetti allevati testati	Soggetti importati testati
478	231
Positivi alla PBFDF	Positivi alla PBFDF
34	7

Discussione

La mancanza di animali positivi nel campione proveniente dal Centro-Sud America conferma quanto riportato in letteratura sull'assenza della malattia nelle popolazioni selvatiche di pappagalli del Nuovo Mondo (2). D'altro canto i due soggetti positivi arrivavano dall'Indonesia e dalla Papua Nuova Guinea, area geografica di origine del Circovirus degli Psittacidi (4). L'importazione in Italia di animali di cattura viene spesso indicata come una possibile fonte di diffusione di malattie. I risultati del nostro studio, confrontati con un precedente lavoro che aveva verificato l'incidenza della PBFDF in pappagalli allevati in Italia (1) mostra una situazione diversa. La malattia sembra più diffusa negli allevamenti nazionali rispetto a quanto incida nei soggetti importati. Tale indicazione è avallata dal fatto che gli uccelli positivi del campione proveniente dal Belgio erano anch'essi di allevamento. Il Circovirus risulta particolarmente resistente nell'ambiente e si diffonde facilmente attraverso le feci e la polvere di piume (5). Gli allevamenti quindi, se non sottoposti a serie misure di biosicurezza, possono risultare fonti di diffusione della malattia. L'importazione di pappagalli di cattura, quindi, sembrerebbe avere un ruolo di minore importanza nella diffusione della PBFDF in Italia rispetto all'allevamento. Resta il fatto che l'arrivo di pappagalli da aree geografiche dove il Circovirus è ampiamente diffuso in natura potrebbe portare all'introduzione sul nostro territorio di nuove varianti del virus, di difficile identificazione (2). Si ritiene pertanto necessario il controllo dei pappagalli d'importazione, con particolare attenzione a quelli provenienti dai paesi del Vecchio Mondo.

Bibliografia

- Bert E., Cerruti Sola S.(2001). Indagine sulla presenza della malattia del Becco e delle Penne (PBFDF) in allevamenti italiani di psittacidi. *Large Anim. Rev.*, 4:123-124.
- Bert E., Grego E., Cerruti Sola S. (2001). Clonazione e sequenziamento dell'ORF1 del virus della Malattia del Becco e delle Penne. *Large Anim. Rev.*, 4:125-126.
- 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.
- Pass D.A., Perry R.A., (1984). The pathology of Beak and Feather Disease. *Aust. Vet. J.*, 61:69-74
- Raidal S.R., McElnea C.L., Gross G.M.(1993). Seroprevalence of Psittacine Beak and Feather Disease in wild psittacine birds in New South Wales. *Aust. Vet. J.*, 70:137-139.
- Ritchie B.W., Carter K. (1995). Psittacine beak and feather disease in Avian viruses: function and control. *Wingers publishing inc.*, Florida, USA, 223-251.
- 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. Microbiol.*, 68:141-148

COMUNICAZIONE 17

APPLICAZIONE DI RT-PCR E METODICHE TRADIZIONALI NELLA RICERCA DI VIRUS INFLUENZALE DI TIPO A IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE IN ANATRE

E. FONI¹, C. CHIAPPONI¹, D. LORI¹, M.A. DE MARCO², M. DELOGU³, E. RAFFINI⁴, P. MASSI⁵

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Parma, Italy - ²Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "A. Ghigi-Ozzano E. (BO), Italy - ³Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria - Bologna, Italy - ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Lugo, Italy - ⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Forlì

Parole chiave: Influenza aviaria, RT-PCR, Infezione Sperimentale, *Anas platyrhynchos*

Application of RT-PCR and standard methods in influenza A virus detection in experimental infection of ducks

Key words: Avian influenza, RT-PCR, experimental infection, *Anas platyrhynchos*

Summary : RT-PCR for detection of influenza A virus using set of primers based on conserved regions of the matrix gene and of the nucleoprotein gene is tested in comparison to embryonated chicken eggs and to three established cell lines (MDCK, NSK, NPTr) in cloacal swabs examination during experimental infection of *Anas Platyrhynchos* with H7N1 avian strain.

Correspondence: Emanuela Foni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" Sezione di Parma, Via dei Mercati 13/A 43100 Parma, e-mail: emanuela.foni@bs.izs.it

Introduzione

L'influenza aviaria si è recentemente manifestata in Italia con due epidemie tra gli anni 1997 e 2000. La prima, sostenuta da un virus influenzale ad elevata virulenza (HPAI) appartenente al sottotipo H5N2, la seconda epidemia, sostenuta da virus H7N1, ha duramente colpito il patrimonio avicolo nazionale (1). La costante circolazione di virus influenzale è stata inoltre dimostrata in anatidi selvatici svernanti in Italia, a ribadire l'importanza di queste specie nella perpetuazione del virus influenzale in natura (4). Va ricordato inoltre che i virus influenzali suini circolanti in Italia e in Europa derivano dal riassortimento genetico tra virus aviari ed umani (2). Non va inoltre sottovalutata la possibilità di trasmissione di ceppi aviari alla specie umana come recentemente avvenuto in Hong Kong (3). Considerati i poliedrici aspetti epidemiologici, viene a rivestire particolare importanza la tempestività della diagnosi di influenza e quindi la disponibilità di uno strumento di rapida conferma del sospetto di infezione. In tal senso l'applicazione di RT-PCR nella ricerca di virus influenzali ha fornito esiti confortanti (7). In questo studio si è voluto confrontare l'utilizzo di metodiche diagnostiche diverse nella dimostrazione di virus influenzale da tamponi cloacali prelevati nel corso di una prova di infezione sperimentale di anatre germanate con virus influenzale H7N1 a bassa patogenicità isolato dal tacchino. La valutazione comparativa ha previsto l'inoculazione di uova embrionale (UE), ritenuta il "gold standard", l'infezione di tre linee cellulari e l'applicazione di RT-PCR alla amplificazione di regioni geniche della matrice (M) e della nucleoproteina (NP) dei virus influenzali di tipo A.

Materiali e metodi

Campioni. La prova di infezione sperimentale è stata realizzata utilizzando 8 anatre germanate (*Anas platyrhynchos* forma domestica) di 50 giorni di età, schiuse ed allevate in condizioni di biosicurezza, virologicamente e sierologicamente negative per influenza. Le anatre sono state infettate per via orale con il virus influenzale a bassa patogenicità A/turkey/Italy/5563/99 H7N1, utilizzando 0,5 ml di liquido allantoideo, diluito in PBS, contenente 10⁶ EID₅₀. Prelievi di tamponi cloacali sono stati eseguiti giornalmente per i primi 5 giorni dopo l'infezione (PID)

e successivamente a 8, 11, 14, 17, 21, 28, 35, 42, 49 PID. A 49 PID i soggetti hanno subito una reinfezione con le stesse modalità e tamponi cloacali sono stati prelevati a 50, 51, 52, 53, 57, 64, 72 PID. In totale sono stati raccolti 168 tamponi cloacali che sono stati conservati in tampone glicerinato a -80° C fino al momento dell'inizio delle prove.

Isolamento virale. Inoculazione di UE per tre passaggi seriali consecutivi è stata eseguita secondo metodiche in uso nel laboratorio (8). Sono state inoltre inoculate tre linee cellulari diverse: due di origine suina, NSK (Newborn Swine Kidney) e NPTr (Newborn Pig Trachea) (5) e una di origine canina, MDCK, che rappresenta il substrato standard per l'isolamento del virus influenzale, secondo metodiche già descritte (6). Si è proceduto a tre passaggi seriali. Ad ogni passaggio liquidi allantoidei e sovranatanti cellulari sono stati esaminati per presenza di attività emoagglutinante (HA) (8). I campioni risultati positivi sono stati esaminati tramite inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando siero iperimmune omologo (8).

RT-PCR. L'RNA virale è stato estratto dai tamponi cloacali (7). Dopo retrotrascrizione, un'aliquota di cDNA è stata utilizzata per la reazione di PCR. La ricerca del genoma virale ha previsto l'utilizzo dei primers M52C e M253R (7), in grado di amplificare una regione codificante la matrice dei virus influenzali di tipo A. Come conferma della specificità della reazione i campioni positivi sono stati ulteriormente testati con i primers A/NP/8/1 e A/NP/522/2 per ricercare la presenza del gene codificante per la NP.

Risultati

Nella tabella 1 sono riportati i dati relativi alla dimostrazione di virus influenzale effettuata utilizzando i diversi substrati e tramite applicazione di RT-PCR. Sono risultati positivi 36 campioni con tecnica RT-PCR, 27 campioni con la tecnica di inoculazione di UE mentre utilizzando il sistema delle colture cellulari si sono registrati 18 casi di positività. Dalla valutazione dei dati si evidenzia come la tecnica di inoculazione di UE detenga ancora la più elevata percentuale di isolamento (16%), a confronto con l'utilizzo contemporaneo di 3 linee cellulari (10,7%). Il paragone fra le linee cellulari, NSK, NPTr, MDCK fa rilevare una

più alta percentuale di isolamenti utilizzando la linea NPTr. Di interesse il dato riguardo alla percentuale di positività dei campioni esaminati tramite RT-PCR (21,4%).

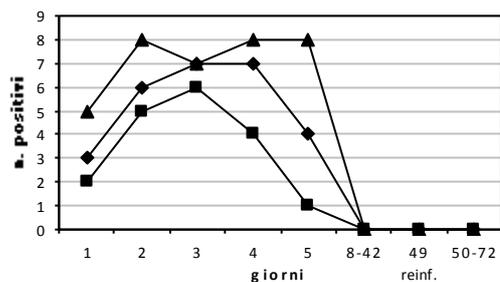
Nella tabella 2 vengono riportati i dati relativi alla valutazione della sensibilità e specificità dei test posti a confronto designando come "gold standard" la tecnica di inoculazione di UE. Si osserva come, utilizzando RT-PCR, si è rilevata positività per presenza di virus influenzale in 9 campioni risultati invece negativi alla prova di inoculazione di UE. Si riscontra invece un valore di ridotta sensibilità (66%) per le colture cellulari, a confronto con l'inoculazione delle uova. Dall'esame del grafico riportato in figura 1 si evince come non sia stato possibile evidenziare la presenza del virus influenzale oltre 8 PID, anche dopo la reinfezione. Confrontando l'andamento delle curve che rappresentano il numero di rilevazioni virali nel tempo si osserva che, da 1 a 5 PID, la RT-PCR ha evidenziato la presenza del virus in 1-2 campioni in più, per ogni giorno di prelievo, mentre dal 5 al 8 PID, con questa metodica, è raddoppiato il numero di rilevazioni virali rispetto all'isolamento in UE.

Tabella 2: Confronto fra i test considerando l'isolamento su uova embrionate come "gold standard"
Table 2: Comparison of diagnostic tests taking embryonated chicken eggs as reference

test1/ test2	+/+	+/-	-/+	-/-	Sensibilità relativa%	Specificità relativa%
PCR/ Uova	27	9	0	132	100	94
Cellule/ Uova	18	0	9	141	66	100

Figura 1: Andamento dei rilevamenti virali tramite diverse tecniche diagnostiche. ▲ positivi in RT-PCR, ◇ isolamenti su UE, ■ isolamenti su cellule

Figure 1: Graph of virus detection using various diagnostic methods. ▲ RT-PCR positives, ◇ UE isolates, ■ cell line isolates



Discussione

L'applicazione di RT-PCR ha permesso di aumentare la percentuale di campioni positivi da 16%, ottenuta utilizzando l'inoculazione di UE, a 21,4%; il numero di campioni positivi in RT-PCR rispetto alla inoculazione di UE è stato maggiore nei campioni prelevati da 5 a 8

Tabella 1: Utilizzo di metodiche diverse per la ricerca di virus influenzale da 168 tamponi cloacali di anatre infettate sperimentalmente

Table 1: Detection of influenza virus in 168 cloacal swabs from experimentally infected ducks by various methods

Metodo	RT-PCR	Uova embrionate				NSK,NPTr,MDCK				NSK				NPTr				MDCK			
		I *	II	III	tot	I	II	III	tot	I	II	III	tot	I	II	III	tot	I	II	III	tot
campioni positivi	36	23	4	0	27	11	6	1	18	8	3	2	13	6	8	0	14	5	3	1	9
% di positività	21.4	13.6	2.4	/	16	6.5	3.6	0.6	10.7	1.2	3.4	4.8	/	3.4	4.8	/	8.2	2.8	1.8	0.6	5.2

* passaggio seriale

PID, periodo nel quale l'eliminazione virale stava diminuendo.

Come ulteriore indagine sulla sensibilità della reazione RT-PCR va riportato che è stato possibile rilevare la positività di un campione anche quando esso è stato diluito 6 volte in campione negativo confermando la possibilità di utilizzare questa metodica anche nello screening di pool di campioni. Non di secondaria importanza è l'aspetto della rapidità con cui si può allestire ed eseguire la prova, riducendo ad 8 ore i tempi di risposta in caso di sospetto di infezione influenzale. L'applicazione delle colture cellulari si conferma di scarso supporto nella diagnostica dell'influenza, a parte il vantaggio di non dover ricorrere all'utilizzo di modelli animali, la percentuale di positività con questa metodica rimane ancora troppo bassa, anche utilizzando tre linee cellulari diverse. Fra queste la linea cellulare suina NPTr ha dimostrato di rilevare la più alta percentuale di positività.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la Dr.ssa Francesca Paganelli, il Sig. Angelo Biondi e la Sig. Roberta Manfredi per la preziosa collaborazione tecnica. Si ringrazia il Dr. R.G. Webster per aver fornito le sequenze dei primer del gene della nucleoproteina.

Bibliografia

1. Capua I. and Marangon S. (2000) The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. Avian Pathol 29, 289-294.
2. Castrucci M.R., Donatelli I., Sidoli L., Barigazzi G., Kawakawa Y. And Webster R.G. (1993) Genetic reassortment between avian and human influenza A virus in Italian pigs. Virology 193, 503-506.
3. Claas E.C., Osterhaus A.D., Van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F. and Webster R.G.(1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet, 351, 472-477.
4. De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Di Trani L., Delogu M., Guberti V., Barigazzi G., and Donatelli I. (2002) Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-1999 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. Fifth International Symposium on Avian Influenza. Athens, Georgia April 14-17, 2002, in press.
5. Ferrari M. et al. (2002) Establishment of new pig cell lines to be used in virological diagnosis field. J Virol. Methods, in press.
6. Foni E., Ferrari M., De Marco M.A., Donatelli I., Barigazzi G. (2000) Use of the NSK cell line in swine and avian species. Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology. Brescia, Italy 27-30 August 2000, 311.
7. Fouchier Ron A.M., Bestebroer S.H., Van de Kemp L., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D. (2000) Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J of Clinical Microbiology Nov 2000, 4096-4101.
8. Kendall A.P., Pereira M.S., Skehel J.J. (1982) "Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance". Atlanta, U.S. Department of Health and human Service.

DIAGNOSI DI ADENOVIRUS AVIARI TIPO 2 MEDIANTE PCR

PERSIA D., MORENO MARTIN A., PACCIARINI M.L., CERIOLI M., CORDIOLI P., MASSI P., LAVAZZA A.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: adenovirus aviari tipo 2, PCR, enterite emorragica, diagnosi virologica

Diagnosis of avian adenovirus type 2 using PCR

Keywords: avian adenovirus type 2, PCR, haemorrhagic enteritis, virological diagnosis

Summary: It is described the use of a new PCR method based on a couple of primers that amplify a 539 bp product, corresponding to a portion of Hemorrhagic Enteritis Virus (HEV) genome located between the endoproteinase gene and the DNA binding protein gene. The results obtained carrying out such test in comparison with Electron Microscopy and the PCR method described by Hess et al. (3) are compared. The samples were obtained either from diagnostic samples of different avian species tested positive in EM for adenovirus or showing lesions referable to adenovirus type 2 infection, as well as from turkeys experimentally infected with HEV. The new PCR method resulted highly sensitive and specific, and it should be considered particularly useful for routine investigations when an adenovirus type 2 is potentially involved as causative agent.

Correspondence: Ana Moreno Martin - Dipartimento Diagnostica Specializzata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia. E-mail: amoreno@bs.izs.it

Introduzione

Gli adenovirus aviari possono essere distinti in tre gruppi (6). Il primo comprende almeno 12 distinti sierotipi "convenzionali", che presentano un antigene comune; Il secondo comprende il virus dell'enterite emorragica del tacchino (HEV), il virus della *marble spleen disease* del fagiano, l'agente della splenomegalia del pollo e della malattia emorragica della faraona. Questi agenti sono sierologicamente distinti da quelli di gruppo 1 ma indistinguibili fra loro, almeno su base sierologica, presentando solo piccole differenze molecolari a livello di DNA. Nel terzo gruppo sono compresi l'agente della EDS 76 isolato da anatra e da pollo, che presenta una parziale cross-antigenicità con i membri del gruppo 1. A differenza degli adenovirus di gruppo 1 e 3 che vengono isolati abbastanza facilmente in vitro, su colture cellulari primarie, gli adenovirus di gruppo 2 sono difficilmente isolabili *in vitro*. La diagnosi virologica pertanto può essere effettuata mediante agar gel precipitazione (AGP), poco sensibile e non quantitativa (1) o in ELISA, meno diffusa ma più sensibile (3). Tra gli altri metodi sviluppati, la PCR (2), grazie alla maggiore sensibilità, è utile per la diagnosi di quelle forme sospette che si accompagnano ad un basso titolo virale non svelabile con AGP ed ELISA.

Proprio partendo da quest'ultimo presupposto abbiamo sviluppato un metodo PCR basato sull'utilizzo di primers differenti rispetto a quelli descritti (2), e verificato l'applicabilità diagnostica, tanto in confronto alla microscopia elettronica in colorazione negativa (ME), quanto alla PCR nota e descritta (2), utilizzando sia campioni diagnostici di diverse specie aviari che da tacchini infettati sperimentalmente con HEV.

Materiali e metodi

Campioni: sono stati analizzati 12 campioni provenienti dalla normale attività diagnostica: di questi 5 (2 milze di pollo, 1 feci di tacchino e 2 milze di fagiano) si riferivano a distinti episodi clinici sospetti d'infezione da adenovirus tipo 2, mentre i restanti 7 campioni (2 proventricolo di pollo, 1 fegato di piccione, 2 intestini di piccione, 1 intestino di starna, 1 liquido allantoideo di pollo) sono stati testati in quanto risultati positivi per adenovirus all'esame al ME. Due campioni di milza prelevati da tacchini con differente sintomatologia,

testati anche sierologicamente per HEV con esito negativo sono stati esaminati come controlli negativi. In aggiunta sono stati esaminati campioni prelevati da due gruppi di tacchini, rispettivamente di 7 e 10-11 settimane di età, infettati sperimentalmente per via i.m. con un ceppo patogeno di HEV ottenuto dal Prof. A.M. Fadly (East Lansing, USA). Tale ceppo determina il 40-50% di mortalità e il 100% di morbidità nei tacchini SPF, mentre in tacchini commerciali la mortalità è molto bassa sebbene il virus induca microlesioni e immunosoppressione. (8). Tacchini commerciali di pari età, vaccinati 1 o 2 volte con un vaccino inattivato del commercio e sottoposti quindi a challenge venivano usati come controlli negativi.

Microscopia Elettronica: l'esame al ME in colorazione negativa previa ultracentrifugazione in Airfuge Beckman è stato eseguito adottando la metodica comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZS di Brescia (4).

Tabella 1: Condizioni finali di reazione (25 µl)

Table 1: Final conditions of amplification (25 µl)

MgCl ₂ 1,5 mM, Tris HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM
dNTP 200 µM
Primer sense (HEV 1F o HEV DIR) 0,5 µM
Primer antisense (HEV 2R o HEV REV) 0,5 µM
Taq DNA pol 1,25 U
H ₂ O + DEPC

Tabella 2: Programmi di amplificazione delle reazioni PCR

Table 2: Amplification programmes of the two PCR reactions

amplificazione HEV1F/HEV2R			amplificazione HEVDIR/HEV REV		
95°C	5 min	1 ciclo	95°C	5 min	1 ciclo
95°C	20 sec	40 cicli	95°C	20 sec	40 cicli
52°C	30 sec		60°C	30 sec	
72°C	30 sec	1 ciclo	72°C	30 sec	1 ciclo
72°C	5 min		72°C	5 min	
4°C	∞		4°C	∞	

PCR: l'estrazione del DNA virale era eseguita dai campioni di milza utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Per l'amplificazione erano utilizzati, in alternativa, due PCR basate sull'uso di coppie di primers differenti: quelli pubblicati da Hess (2), che amplificano una porzione del gene "hexon" di 1646 paia di basi, e una coppia di primers, in grado di amplificare un frammento di 539 bp, selezionati tra il gene "endoproteinase" e il gene "DNA binding protein"

(Figura 1), dopo allineamento ed analisi delle sequenze dei principali adenovirus aviari e mammiferi presenti in banca dati. La reazione di amplificazione era eseguita a partire da 2µl di prodotto di estrazione, alle condizioni finali indicate in tabella 1; per ciascuna delle due reazioni si seguivano il programma di amplificazione riportato in tabella 2. Gli amplificati venivano fatti correre in elettroforesi su gel di agarosio al 1,2% e 1,8% rispettivamente per la prima e seconda reazione PCR, e colorati in bromuro di etidio.

Figura 1: Rappresentazione schematica dell'organizzazione del genoma di HEV con indicate le sequenze e le posizioni dei primers utilizzati nelle due reazioni PCR

Figure 1: Schematic representation of the genome organization of HEV, with indication of the two couples of primers used for the different PCRs and characteristics of the amplified products

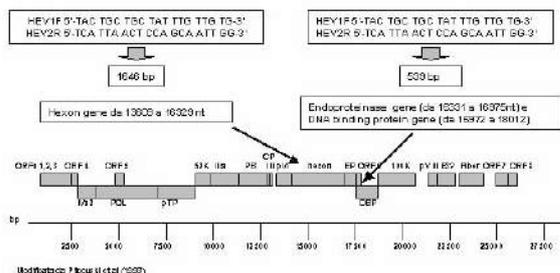


Tabella 3: Risultati dei campioni diagnostici

Table 3: Results obtained from diagnostic samples

Prot.N.	Mat.	Specie	M.E.	PCR 1664bp	PCR 539bp
1378/00	feci	tacchino	+	neg	+
81396/02	milza	pollo	neg	neg	+
81405/02	milza	pollo	++++	+	+
81417/02	milza	tacchino	++++	+	+
84503/02	milza	fagiano	neg	neg	+
520/98	provent.	pollo	+++	neg	neg
771/98	provent.	pollo	+++	neg	neg
1057/98	fegato	piccione	+++	neg	neg
1164/99	intestino	piccione	++	neg	neg
1598/01	liq.allan.	pollo	+	neg	neg
1314/01	intestino	starna	+	neg	neg
1317/01	intestino	piccione	++	neg	neg
120036/02	milza	tacchino	neg	neg	neg
138902/02	milza	tacchino	neg	neg	neg

Tabella 4: Tacchini infettati sperimentalmente

Table 4: Results from experimental infected turkeys

età	n. animali	Marmorizzazione.	M.E.	PCR 1664bp	PCR 539bp
7 sett	1	+	+	+/-	+
	10	++	+	+/-	+
	4	+++	+	+/-	+
10-11 sett	11	neg	neg	neg	+

Risultati e Discussione

I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle 3 e 4. Il test PCR 1664bp è risultato avere una sensibilità pressoché sovrapponibile alla ME, con l'unica eccezione del campione di feci 1378/00 risultato debolmente positivo in ME e negativo alla PCR. Di contro la PCR 539bp è risultata altamente sensibile, fornendo risultato positivo in tutti i casi di positività al ME, ma permettendo anche di giudicare come positivi i campioni diagnostici di milza di pollo (81396/02) e di milza di fagiano (84503/02) negativi agli altri due metodi. La specificità della PCR 539bp è provata, oltre che dalla negatività verso i più comuni adenovirus di mammiferi, testati in fase di approntamento della metodica (dati non presentati), sia dalla negatività

verso altri adenovirus evidenziati alla ME in campioni diagnostici e considerabili, in base ai casi clinici e/o alle caratteristiche di isolamento, come appartenenti al gruppo 1. Per quanto riguarda i tacchini infettati sperimentalmente, mentre nei soggetti di 7 settimane di età erano evidenti lesioni macroscopiche (milza marmorizzata ed in alcuni enterite emorragica e feci diarroiche), con conseguente esito positivo dell'esame al ME, nei soggetti di età maggiore l'esame anatomo-patologico ha evidenziato un aumento molto evidente del volume della milza che, però, non presentava aspetto marmorizzato. In un solo soggetto è stata evidenziata diarrea, ed enterite catarrale. Gli esami al ME hanno dato esito costantemente negativo.

Conclusioni

Il metodo PCR 539bp si è mostrato maggiormente sensibile rispetto al test PCR 1664bp (2); questo si spiega con la maggior facilità ad ottenere prodotti amplificati di peso molecolare <800bp. Tale maggior sensibilità, unitamente all'elevata specificità, la fanno ritenere un valido strumento di diagnosi, anche nel caso di impiego routinario. In particolare, rispetto agli altri metodi testati (ME e PCR 1664bp) la PCR 539bp sembra utile a svelare, nel tacchino, infezioni subcliniche da virus HEV o non caratterizzate da lesioni spleniche ed intestinali evidenti. Quanto osservato nel corso dell'infezione sperimentale di tacchini di maggiore età (10-11 sett.), ovvero semplice aumento del volume della milza ma assenza di marmorizzazione ed enterite, è del resto in accordo con quanto riportato da Meteyer et al (5) che hanno osservato relazioni statisticamente significative tra l'età dei soggetti e le lesioni alla milza. Altrettanto utile potrebbe essere tale metodo nella diagnosi di forme da adenovirus 2 nel fagiano, solitamente però ben caratterizzate dal punto di vista clinico con lesioni e mortalità evidenti, ma anche e soprattutto nel pollo e nella faraona, nelle quali viceversa l'infezione può assumere spesso andamento subclinico.

Bibliografia

1. Domermuth C.H., Gross W.B., DuBose R.T. (1973). Microimmunodiffusion test for haemorrhagic enteritis of turkeys. Avian Dis., 17: 439-444.
2. Hess M., Raue R., Hafez H.M. (1999). PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. J. Virol Meth., 81: 199-203.
3. Hurk van den J. (1986) Quantitation of haemorrhagic enteritis virus antigen and antibody using enzyme-linked immunosorbent assays. Avian Dis., 30: 662-671
4. Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D. (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. Vet. Rec., 126: 581.
5. Meteyer C.U., Mohammed O., Chin R.P., Bickford A.A., Trampel D.W. and Klein P.N. (1992). Relationship between age of flock seroconversion to hemorrhagic enteritis virus and appearance of adenoviral inclusions in the enteritis and renal tubule epithelia of turkeys. Avian Dis., 36: 88-96.
6. Pierson F.W. and Domermuth C.H. (1977). Haemorrhagic enteritis and related infections. In. Disease of poultry, 10th ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDouglas, Y.M. Saif (eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 624-632.
7. Pitcovski J., Mualem M., Rei-Koren Z., Krispel S., Shmueli E., Peretz Y., Gutter B., Gallili G.E., Michael A., Goldberg D. (1998). The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. Virol., 249: 307-315.
8. Rautenschlein S., Sharma J.S. (2000). Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys. Dev. Comp. Immunol., 24: 237-246.

COMUNICAZIONE 19

APPLICAZIONE DEL METODO "POLYMERASE CHAIN REACTION" ALLA DIAGNOSI DI MYCOPLASMA GALLISEPTICUM E DI MYCOPLASMA SYNOVIAE

F. PAGANELLI, P. MASSI, G. TOSI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, esame colturale, polymerase chain reaction

Application of method "Polymerase chain reaction" for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, mycoplasma cultures, polymerase chain reaction

Summary: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) are pathogenic mycoplasmas that affect commercial poultry. MG causes chronic respiratory disease in chickens and sinusitis in turkeys, MS causes upper respiratory infections and synovitis in chickens and turkeys. The diagnosis of these pathogenic avian mycoplasmas has typically been carried out by serological procedures and isolation of the organism. Species-specific polymerase chain reaction (PCR) procedures are effective and rapid methods for detecting MG and MS.

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

Nel pollame prevalgono due specie di micoplasmi, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS). MG è responsabile di sindromi respiratorie a carattere cronico nel pollo e nel tacchino spesso associate, nei soggetti in ovodeposizione, a cali di produzione, alterazioni della qualità del guscio e mortalità embrionale. La sinovite infettiva (sostenuta da MS) è una malattia contagiosa sistemica che coinvolge le membrane sinoviali e produce artrosinoviti e bursiti. MS è inoltre coinvolto nell'eziologia di sindromi respiratorie nel pollo da carne (4). I metodi tradizionali di diagnosi sono basati sull'isolamento del micoplasma e sul riscontro di anticorpi specifici con tecniche sierologiche. La non specificità delle reazioni sierologiche, la cross-reattività fra MG e MS e la necessità di circa 20 giorni per l'isolamento del microrganismo non garantiscono sempre il livello di accuratezza necessario (3). L'applicazione della *polymerase chain reaction* (PCR) si è invece dimostrata un metodo sensibile e specifico. A tale proposito abbiamo voluto valutare l'utilizzo di questa tecnica a scopo diagnostico per MG e MS.

Materiali e Metodi

Preparazione del campione

I campioni di partenza erano costituiti da tamponi tracheali, essudato presente in trachea, nei seni nasali, nelle congiuntive e da liquido sinoviale.

L'estrazione del DNA è stata eseguita su 1 ml di campione diluito con PBS sterile, centrifugato a 14,000 x g per 10 minuti e ripetuta l'operazione di lavaggio del campione. Il pellet è stato risospeso in 70 µl di 0,1% DEPC (diethylpyrocarbonate; Invitrogen®, USA) water.

Il campione è stato incubato a 120°C per 10 minuti e poi a -20°C per altri 10 minuti. Centrifugato ad elevata velocità e trasferito il sovrantante contenente il DNA totale in una eppendorf nuclease free.

Il DNA estratto è stato valutato quantitativamente tramite uno spettrofotometro a 260 nm e a 280nm. Il campione è stato conservato a -20°C.

Polymerase chain reaction

Il protocollo di PCR utilizzato è quello descritto da Lauerman *et al* (2). Il campione (100-2000 ng/5µl) è

stato aggiunto ai reagenti necessari che fanno parte della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA).

Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il primer "forward" MG-F+ e il primer "reverse" MG-R- per MG e i primers MS-F+ e MS-R- per MS (2) (Tabella1).

Tabella 1: Sequenza dei primers.

Table 1: Sequence of primers.

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA (5'-3')
MG-F	GAGCTAATCTGTAAGTTGGTC
MG-R	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC
MS-F	GACAAGCAAATAGTATCA
MS-R	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA

La reazione avviene in un termociclatore automatizzato (Gene Cyclor™, 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 (annealing), 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 1,7%, colorazione con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

MG presenta un frammento di 185 bp mentre MS di 214bp; tutti i campioni sono confrontati con un campione sicuramente positivo e uno negativo, sempre rapportandosi al marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fremontas®, Lithuania).

Esame colturale

Per l'isolamento dei micoplasmi viene utilizzato un terreno agar Frey. Le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera arricchita con il 10% di CO₂ e sono state osservate quotidianamente allo stereomicroscopio.

Dalle colonie sviluppatesi è stata allestita una coltura pura mediante passaggi su terreno solido.

La tipizzazione dei ceppi isolati è stata eseguita attraverso la metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) e mediante l'allestimento delle seguenti prove

biochimiche: fermentazione del glucosio, idrolisi dell'arginina, riduzione del terazolio (sia in anaerobiosi che in aerobiosi) e produzione di "film and spot".

E' stata inoltre valutata l'attività emoagglutinante nei confronti di globuli rossi di pollo (1).

Sono state inoltre allestite prove sierologiche nei confronti di MG e MS mediante l'utilizzo dei seguenti tests: sieroaagglutinazione rapida (SAR), ELISA (KPL®, USA) e inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

Risultati

Da gennaio 2002 a Luglio 2002 sono stati eseguiti 331 esami con la tecnica di PCR sia per MG che per MS: 210 campioni sono risultati negativi per entrambi i micoplasmi, 108 positivi per MG e 13 positivi per MS.

Per 90 di questi campioni è stato possibile eseguire anche esame colturale tradizionale per l'isolamento dei micoplasmi; i risultati di questa doppia ricerca sono riportati in tabella 2.

Tabella 2: Risultati dell'utilizzo della PCR e dell'esame colturale per l'identificazione dell'MG e dell'MS.

Table 2: Detection of MG and MS by PCR and mycoplasma cultures.

CAMPIONI	PCR	ESAME COLTURALE
NEGATIVO (%)	44 (48.8)	70 (77.7)
MG (%)	41 (45.5)	9 (10)
MS (%)	5 (5.5)	/
SVILUPPO DI FLORA MICROBICA (%)	/	11 (12.2)

Discussione

Questi primi dati hanno messo in evidenza una maggiore sensibilità e specificità della PCR rispetto all'utilizzo dell'esame colturale. Con la tecnica di amplificazione del DNA è possibile identificare la presenza di microrganismi anche se in tracce. Un altro vantaggio non indifferente dal punto di vista dell'efficienza diagnostica è il tempo: l'esame colturale richiede circa 20 gg. rispetto ai 2 gg. necessari con la metodica di amplificazione del DNA. Inoltre si è

evidenziata una maggior sensibilità per MS, difficile da isolare tramite l'esame colturale.

Nella microbiologia classica si prevede che le cellule microbiche accettino di replicarsi nei terreni di coltura in cui vengono piastrate; invece il DNA è indipendente dal fatto che il micorganismo sia in grado di replicarsi nel mezzo di coltura. Inoltre anche se si avesse a che fare con cellule dormienti, con metabolismo rallentato che non permetterebbero la replicazione su terreno di coltura, questo non avrebbe niente a che vedere con il sistema di monitoraggio basato sulla PCR.

Con cellule morte o addirittura solo con il cromosoma libero nella cellula si riesce bene a monitorare con la PCR.

Spesso con l'esame colturale non è possibile isolare il micoplasma per la presenza di infezioni secondarie che inficiano la prova, invece con la PCR questo problema non sussiste.

Questo sistema diagnostico, basato sull'amplificazione molecolare si è rilevato altamente sensibile e significativo per una diagnosi più veloce sia di MG che di MS.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il personale tecnico della Sezione IZSLER di Forlì.

Bibliografia

1. Kleven S.H., Yoder H.W. (1989) "Mycoplasmosis" in: American Association of Avian pathologists. Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th edition. Kendal/Hunt publishing company, 57-62.
2. Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shan S.M., Saten V.L. (1993) "Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, 37, 829-834.
3. Maricamen G., Jackwood M.W., Head M., Levisohn S. Kleven S.H. (1996) "Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplication products". *J Vet Diagn. Invest.*, 8, 56-63.
4. Stipkovits L., Kempf I. (1996) "Mycoplasmosis in Poultry". *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 15, 1495-1525.

COMUNICAZIONE 20

SIEROPREVALENZE NEI CONFRONTI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* E *MYCOPLASMA SYNOVIAE* RILEVATE IN EMILIA ROMAGNA IN FAGIANI A VITA LIBERA E ALLEVATI

M. A. DE MARCO¹, M. DELOGU², E. CATELLI², C. TERREGINO³, V. GUBERTI¹

¹ Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "A. Ghigi", Ozzano E. (BO) ² Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Sezione di Patologia Aviaria - Università degli Studi di Bologna ³ Laboratorio di Virologia - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Parole chiave: Fagiano, *Phasianus colchicus*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, indagine sierologica

Seroprevalences against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* detected in free-living and reared pheasants in Emilia Romagna region

Key words: pheasants, *Phasianus colchicus*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, serological survey

Summary: A serological survey for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) antibodies has been performed both in reared and free-living pheasants, in Italy. During 1998, 8 out of 16 examined farms were seropositive to MS. Seroprevalences ranged from 2.6% to 86.8% (44 sampled birds in each farm). Among 128 free-living pheasants, caught between 1995 and 2000, only one bird resulted positive for MG antibodies: it was a pheasant reared and released in the wild.

Correspondence: Maria Alessandra De Marco – Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "A. Ghigi" – Via Ca' Fornacetta 9 – 40064 Ozzano Emilia (BO). Email: infs.adem@iperbole.bologna.it

Introduzione

Il Fagiano (*Phasianus colchicus*) rappresenta il galliforme maggiormente allevato in Italia per fini venatori: la produzione nazionale del 1997 è stata pari a 2.563.280 capi in circa 500 allevamenti (8). La gestione venatoria è prevalentemente caratterizzata dalla liberazione sul territorio di fagiani allevati che vanno a rimpiazzare i capi annualmente prelevati, causando massicce fluttuazioni demografiche dei soggetti a vita libera. Il rilascio in natura di animali allevati può comportare varie problematiche legate al rischio sanitario che questi ultimi possono rappresentare per le zocosenosi riceventi (1).

Tra le malattie trasmissibili dei galliformi, le micoplasmosi rappresentano un problema permanente per il patrimonio avicolo (2) e a carico del Fagiano, nel nostro Paese, sono state recentemente segnalate infezioni da *M. gallisepticum* (MG) (4,9) e da *M. synoviae* (MS) (5). Gli episodi descritti in letteratura si riferiscono quasi esclusivamente a fagiani di allevamento e scarsi sono i dati relativi a soggetti a vita libera.

Mediante un'indagine sierologica, la presente ricerca si propone i seguenti obiettivi:

1) stimare la presenza e diffusione delle infezioni da MG e MS in fagiani a vita libera, catturati in un'area protetta situata in provincia di Bologna;

1) valutare la presenza e diffusione delle suddette infezioni in allevamenti di fagiani dell'Emilia Romagna.

Materiali e metodi

Raccolta dei campioni

Fagiani a vita libera – Durante gli inverni del 1995, 1996, 1999, 2000, presso il fondo dell'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "A. Ghigi" (INFS), nel comune di Ozzano Emilia (BO), sono stati raccolti i sieri di 128 fagiani (Tabella 1) suddivisi alla cattura per classi di età (6).

Fagiani di allevamento - Durante il mese di luglio 1998 sono stati raccolti i sieri di 704 fagiani, di età compresa tra i 60 e i 110 giorni, allevati in 16 diverse aziende di 6 province dell'Emilia Romagna (Tabella 2). Ipotizzando una prevalenza attesa pari almeno al 10%, in ogni allevamento sono stati esaminati 44 soggetti: tale entità di campionamento consente, con

una probabilità del 99%, di individuare almeno un soggetto sieropositivo per MG o MS (3).

Esami di laboratorio

Sono stati utilizzati i kit commerciali "Svanovir[®] *Mycoplasma gallisepticum*-(MG-Ab)" e "Svanovir[®] *Mycoplasma synoviae*-(MS-Ab)" che impiegano una metodica ELISA "blocking" per la ricerca di anticorpi verso *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Seguendo le istruzioni della ditta costruttrice, i risultati sono stati espressi come percentuale d'inibizione di degradazione del substrato (PI): i campioni di siero risultavano positivi (PI > 40%), *borderline* (30% < PI ≤ 40%) e negativi (PI ≤ 30%).

Risultati e discussione

Nei 128 fagiani a vita libera è stata evidenziata una positività sierologica per MG, durante il 1996, in un soggetto allevato e immesso per fini venatori in aree limitrofe al fondo INFS. Il numero di campioni raccolti (Tabella 1) consente di escludere, con una probabilità pari al 90% per una popolazione invernale censita di 150 capi, prevalenze di infezione ≥15% nel 1995 e ≥ 10% durante il 1999 e 2000 (3).

Tabella 1: Sieroprevalenze verso *M. gallisepticum* e *M. synoviae* rilevate in 128 fagiani a vita libera.

Table 1: Seroprevalences against *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* obtained from 128 free-living pheasants, in the Emilia-Romagna region.

periodo invernale	età	<i>M. gallisepticum</i>		<i>M. synoviae</i>	
		pos/es	prev %	pos/es	prev %
1995	juv	0/4	0	0/4	0
	ad	0/18	0	0/18	0
	ind	0/4	0	0/4	0
1996	ad	1*/2	50	0/2	0
1999	juv	0/12	0	0/12	0
	ad	0/36	0	0/36	0
2000	ind	0/7	0	0/8	0
	juv	0/11	0	0/11	0
	ad	0/25	0	0/25	0
	ind	0/8	0	0/8	0

pos/es: positivi/esaminati; prev: prevalenza; juv: nati nell'ultima stagione riproduttiva; ad: nati almeno la stagione precedente; ind: età indeterminata. *soggetto proveniente da allevamento, con lesioni permanenti da copribecco.

Il soggetto sieropositivo per MG è il solo animale catturato proveniente da un allevamento intensivo (Tabella 1) dove potrebbe aver contratto l'infezione o essere stato sottoposto a profilassi vaccinale. In contrasto con recenti segnalazioni di infezione da MG nel Fagiano (4, 9) negli allevamenti esaminati non è stata evidenziata, sierologicamente, tale infezione. Otto aziende sono invece risultate positive per MS, con percentuali di soggetti variabili tra il 2,6% e l'86,8% (Tabella 2). Uno solo di questi allevamenti positivi (12-PC) praticava una "profilassi vaccinale per micoplasmosi" (non meglio specificata dal personale), pertanto gli anticorpi rilevati negli altri sette sono certamente imputabili ad un'infezione da MS in quanto a 60-110 giorni (età del prelievo) non sono più evidenziabili eventuali anticorpi materni. La diversa prevalenza dell'infezione da MS (variabile tra il 2,6% e l'86,8%) potrebbe essere legata al momento della sua insorgenza, più o meno precoce, in allevamento. L'origine dell'infezione da MS potrebbe essere rappresentata dai riproduttori (trasmissione verticale di MS e ciclo chiuso di allevamento), da giovani fagiani acquistati ad un giorno di vita, da altre specie di volatili presenti in allevamento (Tabella 2).

MS è caratterizzato da elevata rapidità di diffusione (superiore a quella di MG) e recentemente è stato segnalato un incremento di virulenza dei ceppi circolanti (2, 7). La presente indagine ha evidenziato l'infezione da MS nel 50% degli allevamenti esaminati, in animali principalmente destinati a ripopolamenti per fini venatori. Il mancato riscontro di positività sierologiche per MS tra i soggetti a vita libera ribadisce quanto sia delicato il problema delle immissioni faunistiche. Tali interventi dovrebbero garantire alte

Tabella 2: Sieroprevalenze nei confronti di *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* rilevate in 704 fagiani giovani campionati in 16 allevamenti dell'Emilia Romagna durante il mese di luglio 1998.

Table 2: Seroprevalences against *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* obtained from 704 young pheasants sampled in game farms of the Emilia Romagna region of northern Italy in July 1998.

allev	n ripr	n giov *	altre specie aviarie presenti in allevamento	<i>M. gallisepticum</i>				<i>M. synoviae</i>			
				p	bl	ne	%	p	bl	ne	% [^]
1-RA	6.000	150.000	starna	0	0	44	0	0	7	44	0
2-RA	2.500	60.000	starna, pernice rossa, pavone, anatra	0	0	44	0	0	7	44	0
3-RA	1.400	22.000	starna, pernice rossa	0	0	44	0	33	6	44	86,8
4-RA	10.000	300.000	--	0	0	44	0	0	7	44	0
5-RA	2.000	55.000	anatra, faraona, piccione	0	0	44	0	0	14	44	0
6-PR [§]	5.000	70.000	pollo, piccione, faraona, quaglia	0	0	44	0	0	6	44	0
7-PR	1.000	25.000	--	0	0	44	0	2	11	44	6,1
8-FC	500	25.000	starna, pernice rossa	0	0	44	0	0	13	44	0
9-FC	--	1.000	starna, piccione	0	0	44	0	1	15	44	3,4
10-FC	100	2.800	starna, pernice rossa, tacchino, pollo, quaglia	0	0	44	0	2	9	44	5,7
11-PC	200	5.000	--	0	0	44	0	0	1	44	0
12-PC [§]	1.000	30.000	quaglia, anatra	0	0	44	0	3	4	44	7,5
13-BO	72	3.500	starna	0	0	44	0	1	26	44	5,6
14-PC	310	7.500	starna, pernice rossa	0	0	44	0	5	18	44	19,2
15-MO	500	20.000	pollo	0	0	44	0	0	22	44	0
16-FC	--	2.200	pernice rossa, chukar, pollo	0	0	44	0	1	6	44	2,6

allev: allevamento; n: numero; ripr: riproduttori; giov: giovani; p: positivi; bl: borderline; ne: numero esaminati; --: nessuno; %: rapporto positivi/(positivi+negativi) (%); RA: Ravenna; PR: Parma; FC: Forlì-Cesena; PC: Piacenza; BO: Bologna; MO: Modena.

* Non tutti gli animali giovani sono nati in allevamento, alcuni sono stati acquistati a un giorno di vita.

[^] I campioni risultati borderline sono stati esclusi dal calcolo delle prevalenze.

[§] Allevamenti che applicano un programma di profilassi vaccinale per le micoplasmosi.

opportunità di sopravvivenza degli animali rilasciati escludendo rischi sanitari per le zoonosi riceventi (1).

Bibliografia

- Anonimo (1997) "Linee guida per la prevenzione del rischio sanitario legato alle immissioni di fauna selvatica sul territorio nazionale". In: Spagnesi M., Guberti V., De Marco M.A. (Eds.). Atti del Convegno Nazionale: Ecopatologia della Fauna Selvatica, Suppl. Ric. Biol. Selvaggina, XXIV, 715-720.
- Bradbury J.M. (2000) "Micoplasmosi nel pollo, problema sempre attuale". Rivista di avicoltura, LXIX (2), 24-26.
- Cannon R. M., Roe R. T. (1982) "Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians". Australian Government Publishing Service, Canberra, 1-35.
- Capua I., Lavazza A. (1999) "Principali patologie presenti nell'allevamento avicolo durante il 1998". La Selezione veterinaria, (8-9), 533-541.
- Catelli E., Benassi M. C., Maestrini N. (1990) "Evoluzione della patologia in alcune specie di galliformi selvatici allevati intensivamente nell'ultimo decennio. In: Rambotti F., Gabrielli G., Canosci D. (Eds). Atti XII Convegno Nazionale Allevamenti di Selvaggina. Cagliari, 97-106.
- Cattadori I., Gatti P., Toso S. (1997) "Fagiani naturali e di allevamento: confronto fra alcuni parametri biometrici". In: Spagnesi M., Toso S., Genovesi P. (Eds). Atti del III Convegno Nazionale dei Biologi della Selvaggina, Suppl. Ric. Biol. Selvaggina, XXVII, 423-430.
- Stipkovits L., Kempf I. (1996) "Mycoplasmoses in poultry". Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 15 (4), 1495-1525.
- Paganin M. (1999) "Avifauna, l'allevamento in Italia". Rivista di Avicoltura, LXVIII (3), 9-11.
- Tosi G., Massi P. (2000) "Infezione oculare da *Mycoplasma gallisepticum* in varie tipologie d'allevamento". Large Animals Review, 7 (6), 95-96.

COMUNICAZIONE 21

APPLICAZIONE DEL SISTEMA AUTOMATIZZATO (VIDAS®) PER LA RICERCA DI *SALMONELLA SPP*: COMPARAZIONE CON IL METODO MICROBIOLOGICO TRADIZIONALE

L. FIORENTINI¹, P. MASSI¹, G. TOSI¹, TABANELLI S.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sez. Diagnostica di Forlì

²BioMerieux-Italy

Parole chiave: *Salmonella*, VIDAS, ELFA, microbiologia tradizionale

Comparative study between VIDAS system and microbiology test for detection of *Salmonella spp.*

Key words: *Salmonella*, VIDAS, ELFA, traditional microbiology

Summary: a comparative studies between VIDAS and microbiological test to detection *Salmonella*, was carried out on 353 samples during four months at diagnostic laboratory of I.Z.S.L.E.R. in Forlì. VIDAS *Salmonella* is a fully automated method for the immuno-concentration of *Salmonella* from foods. It replaces traditional selective enrichment procedures with an automated immunological capture and specific release process. The released organisms may then be transferred to a non selective broth for growth prior to detection by immunoassay, or directly plated on a specific *Salmonella* agar. Results of this trial showed an efficacy of this test very similar to traditional method.

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

Introduzione

In un periodo complessivo di circa quattro mesi, compreso tra aprile e luglio 2002, sono stati sottoposti ad esame per ricerca *Salmonella* 2291 campioni conferiti alla Sezione Diagnostica di Forlì dell'I.Z.S.L.E.R.. Di questi, 353 sono stati analizzati in doppio con metodo microbiologico "tradizionale" e con sistema automatizzato VIDAS® *Salmonella*, BioMerieux-Vitek U.S.A. (test qualitativo impiegato normalmente per i prodotti alimentari e per campioni ambientali, entrato quindi nell'uso comune di molti laboratori annessi alle industrie alimentari). Contemporaneamente alla routine diagnostica, sono state fatte prove sperimentali di comparazione tra metodo VIDAS *Salmonella* e microbiologico tradizionale a partire da 90 campioni "drogati" con 400 UFC/ml di *Salmonella typhimurium* (valore minimo rilevabile dal VIDAS).

Materiali e metodi

Sistema VIDAS® *Salmonella*

E' un sistema automatizzato selettivo per l'esecuzione di determinazioni immunoenzimatiche che permette l'individuazione di antigeni di *Salmonella* attraverso il metodo ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Le *Salmonelle* formano un gruppo antigenico complesso con più di 2200 *serovar* differenziati da antigeni somatici (O) di natura liposaccaridica, e da antigeni flagellari (H) di natura proteica. Il test VIDAS utilizza anticorpi monoclonali di cattura ad alta specificità, tutti diretti contro antigeni O ed H. Una volta terminato il test, al massimo dopo 24 ore, i risultati vengono analizzati automaticamente da un sistema informatico.

Metodo microbiologico tradizionale

E' un metodo qualitativo che richiede cinque successivi stadi:

- pre-arricchimento in terreno liquido non selettivo (acqua peptonata tamponata) inoculato con il campione in esame e, dopo omogeneizzazione, incubato a 37°C per 24 ore
- arricchimento in terreni liquidi selettivi (brodo selenito cistina o/e brodo Rappaport Vassiliadis), incubazione a 37°C o 42°C a seconda del terreno utilizzato per 24 ore

- piastratura su terreno solido selettivo e differenziale (Hektoen Enteric Agar) quindi incubazione a 37°C per 24 ore
 - trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar, incubazione a 37°C per 24 ore
 - Identificazione biochimica e sierologica delle colonie trapiantate
- Il tempo necessario per la diagnosi è di almeno 72 ore.

Risultati

I risultati sono riportati nelle tabelle 1 e 2

Discussione

La ricerca della *Salmonella* richiede normalmente, per una corretta diagnosi, almeno tre giorni; è lecito considerare questi tempi necessari "piuttosto" lunghi. Sicuramente lo sviluppo e la messa a punto di mezzi diagnostici mirati consentirà il riconoscimento immediato del patogeno con la possibilità di intervenire tempestivamente. Il VIDAS consente di ridurre i rischi legati alle contaminazioni crociate durante l'esecuzione dell'analisi; ogni analisi ha una registrazione completa (codice a barre, *report* completo); l'automazione consente un'interpretazione obiettiva dei risultati indipendentemente dall'operatore; i *kits* pronti all'uso riducono al minimo le fasi che richiedono interventi manuali; sono ridotti i tempi necessari per giungere alla diagnosi (da 24 a 48 ore); viene meglio ripartito il carico di lavoro settimanale del laboratorio. I limiti del VIDAS sono soprattutto legati al non trascurabile costo degli esami, alla cattiva preparazione o conservazione dei campioni la quale può inficiare la prova; inoltre reazioni crociate possono essere osservate con alcuni ceppi di *Citrobacter* e *Hafnia*, anche se in percentuale trascurabile.

Sulla base dei risultati ottenuti, il sistema VIDAS si può considerare affidabile anche su matrici diverse (feci, residui di incubazione, uova embrionate, visceri prelevati in sede autoptica) da quelle testate fino ad oggi con tale metodo, applicabile quindi ai piani di controllo ufficiale ed di autocontrollo per *Salmonella spp.*

Ringraziamenti

Si ringrazia il personale tecnico del laboratorio di diagnostica batteriologica I.Z.S.L.E.R. Sez. di Forlì

Bibliografia

1. Division of Microbiology- Center for Food safety and applied nutrition – U.S. F.D.A. Bacteriological analytical. 6th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 7.01-7.18
2. ICMSF Microorganisms in food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd Edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 160-172
3. F.D.A., Bacteriological Analytical Manual, 7th ed., 1992, publ. And dist. By AOAC International, Arlington, Virginia, 2201-3301, USA
4. Norme ISO 6579, Directives generales concernant les methods de recherche des *Salmonella*, AFNOR, Dicembre 1993
5. Kerrs., H.J. Ball, D.P. Mackie, D.A. Pollock and D.A. Finlay, Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membran protein for rapid detection of *Salmonella*, Journal of Applied Bacteriology, 1992, 72, 302-308

Tabella 1: Esami di diagnostica batteriologica eseguiti in doppio

Table 1: Bacteriological examinations carried out with both methods

Numero di campioni	353	
Metodo	VIDAS <i>Salmonella</i>	Tradizionale
Positivi	4 (1,1%)	3 (0,8%)
Negativi	349 (98,9%)	350 (99,2%)
Falsi Positivi*	2 (0,5%)	0

*Falsi positivi: due ceppi di *Citrobacter freendy*

Tabella 2: Esami sperimentali eseguiti in doppio a partire da campioni drogati con 400 UFC/ ml di *Salmonella typhimurium*

Table 2: Experimental tests carried out with both methods on samples added with 400 cfu/ml of *Salmonella typhimurium*

Numero di campioni	90	
Metodo	VIDAS <i>Salmonella</i>	Tradizionale
Positivi	79 (87,7%)	69 (76,6%)
Negativi	11 (12,3%)	21 (23,4%)
Falsi Positivi	0	0

COMUNICAZIONE 22

INFEZIONE DA PNEUMOVIRUS AVIARE NEL TACCHINO DA CARNE E NEL BROILER: INDAGINI DI CAMPO

E. CATELLI¹, M. CECCHINATO¹, M. DELOGU¹, P. DE MATTEO¹,
M.A. DE MARCO², G. ORTALI³, P. PESENTE³, L. SARTI¹, C. FRANCIOSI¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna - Ozzano Emilia (BO) - Italia; ²Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica - Ozzano Emilia (BO) - Italia; ³Azienda Agricola Tre Valli - Verona - Italia

Parole chiave: Rinotracheite del tacchino, TRT, Pneumovirus aviare, Tacchino da carne, Broiler

Avian pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: field survey

Key words: Turkey rhinotracheitis, TRT, Avian Pneumovirus, Meat turkey, Broiler

Summary: A Survey on Avian Pneumovirus (APV) infection in Italy is reported. Nine turkey meat farms and 6 broiler farms, sited in Verona Province, were sampled for virus isolation on tracheal organ coltures and ELISA serological assay. APV infection was found to be widely spread in the area sampled. APV was isolated in 19 day old turkeys, and in 34, 42 and 48 day old broilers. All turkeys of more than 4 weeks old were APV positive to ELISA. The protocol for APV isolation was shown to be effective. Further developments are discussed.

Correspondence: Elena Catelli - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Via Tolara di Sopra 50 - 40064 Ozzano Emilia (BO). Email catelli@vet.unibo.it

Introduzione

L'isolamento in Italia di Pneumovirus aviari (APV), agenti responsabili della Rinotracheite del Tacchino (TRT) e coinvolti nella eziologia della Sindrome della Testa Gonfia del Pollo (SHS), risale alla fine degli anni '80 (4; Franciosi C., comunicazione personale). Da allora sia la TRT sia la SHS sono state evidenziate sierologicamente (5,8) e positività anticorpali sono state riscontrate anche in fagiani allevati e a vita libera (2). Dal 1990 non sono stati descritti in Italia ulteriori isolamenti virali in nessuna delle specie sensibili. Non poche, infatti, sono le difficoltà che si incontrano nell'isolamento quali il breve periodo di eliminazione virale e, nel pollo, la non coincidenza dello stesso con la comparsa della sintomatologia clinica. La presenza di altri virus respiratori è inoltre in grado di interferire con la replicazione virale su colture di anelli tracheali. Carenti sono quindi le informazioni sui ceppi di APV circolanti nel nostro Paese, se si escludono le tipizzazioni molecolari eseguite sui primi isolati italiani, che sono risultati appartenere al sottotipo B (7; Sperati Ruffoni L., comunicazione personale). Il presente lavoro riporta indagini di campo svolte nel tacchino e nel pollo da carne allo scopo di evidenziare la presenza dell'infezione da APV mediante isolamento virale ed indagini sierologiche.

Materiali e Metodi

Campionamento. Sono stati campionati 9 allevamenti di tacchini da carne, e 6 di polli da carne, scelti in base all'età, appartenenti tutti ad una azienda avicola del nord Italia, e localizzati quasi esclusivamente in provincia di Verona; la azienda denunciava frequenti focolai di TRT. Ogni allevamento è stato di norma campionato una sola volta. Le età dei gruppi di tacchini sono state scelte in modo da coprire l'arco di tempo in cui più frequentemente la TRT compare nel ciclo di produzione. Nella scelta delle età dei gruppi di broiler è stato coperto tutto il ciclo di produzione. Sia i gruppi di tacchini sia quelli di polli provenivano da allevamenti di riproduttori vaccinati per TRT.

Considerando che l'infezione ha morbilità che facilmente raggiunge il 100% e quindi prevalenze attese superiori al 25 %, e che la popolazione di ciascun gruppo era > di 3500 soggetti, 16

campioni/gruppo erano più che sufficienti per evidenziare l'infezione con un livello di confidenza del 99% (1). Da ciascun animale è stato raccolto un tampone rinofaringeo, destinato all'isolamento virale, ed un campione di sangue per esami sierologici. In presenza di sintomatologia respiratoria sono stati scelti i soggetti con forma clinica iniziale. I tamponi sono stati processati in 2 pool da 8 per avere una maggior concentrazione virale nell'inoculo ed aumentare la possibilità di isolamento, immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di ghiaccio fondente sino al momento della inoculazione che era eseguita di norma immediatamente all'arrivo in laboratorio. Quattro allevamenti di polli da carne (M, O, P e Q) sono stati sottoposti ad un secondo prelievo di sangue a distanza di circa 15 gg dal primo.

Isolamento virale. L'isolamento virale è stato eseguito su colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC), preparate a partire da embrioni di pollo SPF al 18-20° giorno di incubazione (3). Le colture erano ritenute positive se si osservava ciliostasi entro 10 giorni dalla inoculazione e la conferma dell'isolamento era ottenuta mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) (6) su sezioni criostatiche delle colture positive (Figura 1). A 4 giorni dall'inoculazione il terreno di 5 delle 10 TOC inoculate per campione veniva raccolto per i passaggi successivi. Il campione era ritenuto negativo dopo 3 passaggi ciechi su TOC. I campioni prelevati dagli allevamenti di broiler, prima della inoculazione, erano sottoposti a sieroneutralizzazione per i sierotipi di Bronchite Infettiva (BI) 624/I, 793/B ed M41, maggiormente diffusi nell'area campionata, allo scopo di neutralizzare i coronavirus della BI eventualmente presenti, e poi processati come descritto precedentemente. Tali coronavirus hanno attività ciliostatica su TOC e sono in grado di inibire la replicazione di APV.

Sierologia. Per gli esami sierologici è stato utilizzato un kit ELISA del commercio di tipo "blocking" (Svanovir® Avian Pneumovirus-Ab EIA Test Kit).

Risultati

I risultati dell'indagine nel tacchino da carne sono riportati in Tabella 1. È stato isolato APV solo in un

allevamento, in soggetti di 19 giorni, con forma respiratoria riferibile a TRT in atto. In nessuna altra occasione è stato isolato APV, tuttavia nei soggetti di età maggiore di 4 settimane è stata osservata positività all'ELISA con percentuali del 100%; tali allevamenti avevano mostrato in passato sintomatologia respiratoria. Nel pollo da carne (Tabella 2) APV è stato isolato in 3 gruppi con età di 34, 42 e 48 giorni. Al momento del prelievo i soggetti risultavano tutti sieronegativi. Gli allevamenti positivi all'isolamento hanno mostrato sierconversione dopo 15 giorni. In questo arco di tempo, sono state osservate forme respiratorie lievi o medie con comparsa, in alcuni soggetti, di sindrome della testa gonfia.

Discussione

La nostra indagine ha portato all'isolamento di APV sia nel tacchino sia nel pollo da carne ed alla evidenza sierologica di una elevata diffusione dell'infezione virale nella seppur limitata zona campionata. La tecnica di isolamento su colture di anelli tracheali di embrione di pollo è risultata efficace. A causa delle difficoltà precedentemente descritte, scarse sono in letteratura le segnalazioni di isolamenti virali nel pollo. A conferma di ciò i nostri risultati evidenziano come sia possibile isolare il virus solo quando la sintomatologia è appena iniziata o ancora assente. Inoltre il successo dell'isolamento è, a nostro parere, da attribuirsi anche alle modalità di gestione dei campioni. Riteniamo critici la concentrazione di più tamponi in volumi ridotti, la rapida refrigerazione, il mantenimento a temperatura di ghiaccio fondente, l'immediata inoculazione in colture d'organo o la conservazione a -80 °C. Le piene positività sierologiche osservate in tutti gli allevamenti di tacchini con età superiore alle 4 settimane confermano l'ampia diffusione dell'infezione nell'azienda considerata. Interessante sarà poter ampliare l'indagine ad altre regioni italiane ed agli allevamenti di riproduttori allo scopo di avere un quadro più completo della situazione epidemiologica italiana. La tipizzazione molecolare degli isolati ottenuti potrà inoltre fornire preziose informazioni sui sottotipi presenti in Italia.

Bibliografia

1. Cannon R.M., Roe R.T., (1982) "Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians". Australian Bureau of Animal Health. Canberra, Australian Government Publishing Service: 17.
2. Catelli E., De Marco M.A., Delogu M., Terregino C., Guberti V. (2001). "Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants." Veterinary Record, 149, 56-58.
3. Cook, J.K.A, Darbyshire J.H. e Peter R.W. (1976) "The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus ". Archives of Virology, 50, 109-118.
4. Fabris G., D'Aprile P.N. (1990) "Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio". Zootecnica International (6), 36-40.
5. Fabris G., Della Valentina M., Gavazzi L., Gozzini P., (1998) "TRT nei tacchini. Indagine sierologica in animali vaccinati e non vaccinati". La Selezione Veterinaria, (8-9), 645-654.
6. Jones R.C., Williams R.A., Baxter-Jones C., Savage C.E., Wilding G.P. (1988) "Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response". Avian Pathology, 17, 841-850.

7. Juhasz K., Easton A.J. (1994) "Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups". Journal of General Virology, 75, 2873-2880.
9. Massi P. (1997) "Riepilogo delle principali patologie aviarie osservate nel corso del 1996 nelle diverse regioni italiane". La Selezione Veterinaria, (8-9), 537-541.

Tabella 1: Risultati della indagine virologica e sierologica negli allevamenti di tacchini

Table 1: Results of the virological and serological survey in turkey farms

Allev.	Età gg	Sintomat. respiratoria	Isolam. APV TOC + IFI	ELISA (Pos/Camp) %*
A	13	no	Neg.	100
B	19	In atto	Pos.	92
C	26	no	Neg.	15
D	37	Pregressa	Neg.	100
E	43	Pregressa	Neg.	100
F	50	Pregressa	Neg.	100
G	56	Pregressa	Neg.	100
H	62	Pregressa	Neg.	100
I	73	Pregressa	Neg.	100

Note: Pos.=positivi; Neg.=negativi; Camp.=campionati; * I sieri risultati "borderline" non sono stati considerati nel calcolo percentuale.

Tabella 2: Risultati della Indagine virologica e sierologica negli allevamenti di polli

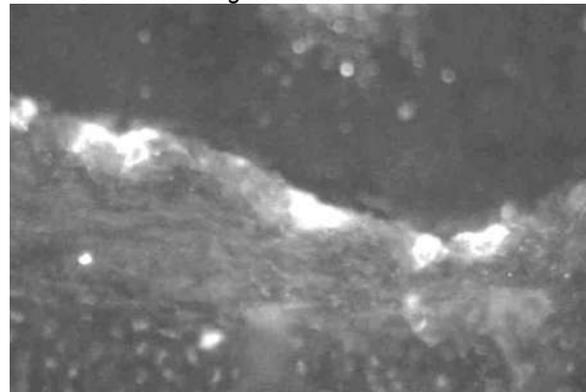
Table 2: Results of virological and serological survey in broiler farms

Allev.	Età gg	Sintomat. respiratoria	Isolam. APV TOC + IFI	ELISA (Pos/Camp) %*	
				1°	2° (15 gg)
L	15	no	Neg.	50	n.e.
M	21	In atto	Neg.	0	0
N	28	In atto	Neg.	0	n.e.
O	34	successiva	Pos.	0	100
P	42	successiva	Pos.	0	100
Q	48	successiva	Pos.	0	100

Note: Pos.=Positivi; Neg.=Negativi; Camp.=campionati; n.e.= non eseguiti; * I sieri risultati "borderline" non sono stati considerati nel calcolo percentuale.

Figura 1: Immunofluorescenza indiretta positiva per APV su organocoltura tracheale

Figure 1: Indirect immunofluorescence stain positive for APV - tracheal organ culture



COMUNICAZIONE 23

IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO CON LA POLYMERASE CHAIN REACTION

F. PAGANELLI, P. MASSI, G. TOSI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: virus dell'anemia infettiva del pollo, isolamento virale, polymerase chain reaction, MDCC-MSB1.

Detection of chicken infectious anaemia virus with polymerase chain reaction

Key words: chicken infectious anaemia virus, polymerase chain reaction, MDCC-MSB1, isolation of the virus

Summary: Chicken infectious anaemia virus (CIAV) causes aplastic anaemia, generalized lymphoid atrophy and increased mortality in susceptible chickens. CIAV is a nonenveloped, icosahedral, single-stranded DNA virus in the family Circoviridae. Three proteins are expressed in CIAV-infected cells, VP1, VP2 and VP3. The diagnosis of CIAV has typically been carried out by serological procedures and isolation of the organism. Therefore, molecular techniques such as polymerase chain reaction have been widely used to detect viral DNA in infected cells.

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 dell'anemia infettiva del pollo (CIAV) appartiene alla famiglia *Circoviridae* e al genere *Gyrovirus*. CIAV ha una struttura icosaedrica ed è privo di *envelope*. Il capsido, è costituito da una sola proteina e contiene DNA circolare a banda singola di 2319 nucleotidi. Il genoma codifica tre proteine virali note: VP1, VP2 e VP3, sintetizzabili e reperibili nella cellula infetta. VP1 è una proteina capsidica, mentre VP2 non sembra sia una proteina strutturale, pur risultando indispensabile per l'assemblaggio del virus e per la stimolazione anticorpale neutralizzante. La proteina VP3, piccola proteina composta di 121 aminoacidi, è una apoptina perché coinvolta nel fenomeno di apoptosi. CIEV è responsabile di una patologia caratterizzata da anemia aplastica, atrofia linfoide e conseguente immunodepressione. Nella sua forma acuta la malattia si osserva nei primi 20 giorni di vita come conseguenza della trasmissione verticale del virus. CIAV può inoltre provocare, nelle fasi successive del ciclo di allevamento, infezioni subcliniche legate alla trasmissione orizzontale del virus e responsabili di sensibili peggioramenti degli indici zootecnici dei gruppi colpiti. Ai fini diagnostici si utilizzano come test sierologici l'immunofluorescenza indiretta (IFI) e l'ELISA; mentre per l'isolamento virale sono necessarie le colture cellulari. Il virus replica soltanto su particolari linee linfoblastoidi, originate da linfomi della malattia di *Marek* (MDCC) o della Leucosi aviare (LSCC) e coltivate in sospensione. La linea più usata è senza dubbio la MDCC-MSB1 (linfoma splenico). Con questo lavoro si è cercato di valutare la possibilità di utilizzare la *polymerase chain reaction* (PCR) per identificare CIAV, grazie alla presenza nel genoma di sequenze altamente conservate (1), interessate nella sintesi delle tre proteine note.

Materiali e metodi

Infezione su colture cellulari

Sono stati presi in esame 10 casi clinici che presentavano un quadro anatomopatologico riferibile a CIAV. Il campione di partenza, costituito da fegato, milza e midollo osseo, è stato omogenizzato con PBS antibiotato, centrifugato a 3,000 x g e filtrato a 450 nm. Per la ricerca del CIAV sono state utilizzate colture cellulari in sospensione MDCC-MSB1, che richiedono

il *medium* RPMI-1640 con il 7% di siero fetale bovino e il 7% di tryptose phosphate broth (TPB). Le flask da 25 cm², contenente circa 3 x 10⁵ cell/ml, sono state inoculate con 0,8 ml del sovrantante ottenuto e 7,2 ml della sospensione cellulare. Le colture cellulari sono state incubate a 39°C, CO₂ 5%.

Ogni 48 ore è stata effettuata una subcultura, allo scopo di aumentare il numero delle cellule disponibili e di indurre un nuovo ciclo evolutivo della linea.

Le subcolture sono state eseguite fino a quando non si è presentato l'effetto citopatico ben visibile al microscopio ottico: mortalità cellulare, cellule globose e deformi, disaggregazione della cromatina con occasionale presenza di vacuoli nucleari.

Estrazione del DNA e PCR

L'estrazione del DNA virale dalla sospensione cellulare è stata eseguita secondo il protocollo QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-Hilden®, Germany).

Il prodotto di estrazione è stato utilizzato direttamente nel saggio di PCR previa l'aggiunta dei reagenti e del tampone necessario che fanno parte della PlatinumTaqPCRx DNAPolymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il primer "forward" P3+ e il primer "reverse" P4- che producono un frammento di 252bp (4) (Tabella 1), interessato nella sintesi della proteina VP2 e VP3.

I campioni di DNA sono stati analizzati mediante un'altra PCR usando i primers CA1N+ e CA2N-, che corrispondono alla posizione nucleotidica 503-522 e 982-963 del genoma virale (2) (Tabella 1). Il frammento amplificato è di 480bp e fa parte dei geni che codificano per la VP1 e la VP3. La reazione di PCR avviene secondo il seguente profilo: 5 minuti a 94°C, seguiti da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, *annealing* a 60°C per 30 secondi e l'estensione a 72°C per 30 secondi; al termine dei cicli 5 minuti a 72°C per eventuali estensioni.

Il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5%, con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV. In ogni reazione era presente un campione di controllo positivo e uno negativo.

La specificità del prodotto di PCR è stata confermata con l'utilizzo degli enzimi di restrizione PstI e SacI (3).

Risultati

I 10 campioni esaminati hanno presentato sulle MDCC-MSB1 l'effetto citopatico riferibile al virus dell'anemia infettiva fra la 5° e l'8° subcoltura.

E' importante evidenziare che un campione viene ritenuto negativo per CIAV dopo aver eseguito 10 subcolture, sempre in doppio.

Con la tecnica di PCR tutte le 10 sospensioni cellulari sono risultate positive con entrambe le coppie di primers utilizzate (Tabella 2).

Discussione

Questi primi dati hanno rilevato una possibile applicazione della metodica PCR per l'identificazione del virus dell'anemia infettiva; tutti i campioni hanno presentato una correlazione positiva fra i dati anamnestici, il quadro anatomopatologico, l'esame su MCD-MSB1 e mediante PCR. E' importante evidenziare la possibilità di controllare ulteriormente il prodotto di PCR con specifici enzimi di restrizione. Entrambe le coppie di primer (CA1N-CA2N e P3-P4) sono risultate specifiche e sensibili ai 10 isolati di CIAV.

La tecnica di amplificazione rende possibile un risultato diagnostico in minor tempo rispetto all'utilizzo delle colture cellulari: 2 giorni contro i 15-20 giorni necessari per le colture cellulari. Inoltre è possibile rilevare la presenza del virus anche se non si presenta in fase replicativa; infatti, con l'utilizzo della PCR non è

Tabella 1: Sequenza e posizione dei primers

Table 1: Sequence and position of primers

NOME	SEQUENZA (5'-3')	POSIZIONE NUCLEOTIDICA
P3	AATGAACGCTCTCCAAGAAG	464-483
P4	GGAGGCTTGGGTTGATCGGTC	715-695
CA1N	CCAAGAAGATACTCCACCCG	503-522
CA2N	TACGATACCGCTGTCTCCTC	982-963

possibile valutare se il virus è vivo o integro. Questa metodica di amplificazione può essere usata per un monitoraggio di assenza o presenza del DNA virale, anche semplicemente come controllo di contaminazione delle linee cellulari utilizzate in diagnostica.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

1. Farkas T., Tanaka A., Kai K., Kanoe M. (1996). "Cloning and sequencing of the genome of chicken anaemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strains." J. Vet. Med. Sci. 58, 681-684.
2. Imai K., Mase M., Yamaguchi S., Yausa N., Nakamura K., (1998). "Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction". Res.Vet. Sci. 64, 205-208.
3. Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D., Muller H. (2001) "Genetic determinants of in vitro growth of chicken anaemia virus" in: Il International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia, Rauschholzhausen, Germany, 16-20 June 2001, 130-143.
4. Yamaguchi S., Kaji N., Munang'andu M., Kojima C., Mase M., Tsukamoto K. (2000). "Quantification of chicken anaemia virus by competitive polymerase chain reaction". Avian Pathol., 29, 305-310.

Tabella 2: Risultati ottenuti su MCD-MSB1 e mediante PCR

Table 2: Comparative results between MDCC-MSB1 and PCR.

CAMPIONI	MCD-MSB1	PCR (P3-P4)	PCR (CA1N-CA2N)
1	+ (5° subcoltura)	+	+
2	+ (5° subcoltura)	+	+
3	+ (7° subcoltura)	+	+
4	+ (6° subcoltura)	+	+
5	+ (8° subcoltura)	+	+
6	+ (6° subcoltura)	+	+
7	+ (7° subcoltura)	+	+
8	+ (7° subcoltura)	+	+
9	+ (6° subcoltura)	+	+
10	+ (5° subcoltura)	+	+

COMUNICAZIONE 24

MONITORAGGIO DEL CS-137 E STATO SANITARIO DI AVIFAUNA MIGRATORIA DI PROVENIENZA EST-EUROPEA

R. PEZZOTTI¹, E. CAVALLONE², G. GRILLI¹, D. GALLAZZI¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano

²Laboratorio Centralizzato dei Radioisotopi, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: tordo bottaccio, pettirosso, Cs-137, contaminazione, stato sanitario

Monitoring for Cs-137 and health status of east European migratory birds

Key words: song thrush, robin, Cs-137, pollution, health status

Summary: after the Chernobyl nuclear accident in 1986 all Europe has dealt with a more or less high environmental radioactivity. Since insectivorous birds, like song thrushes (*Turdus philomelos*) and robins (*Erithacus rubecula*), migrating to our latitudes usually nest in areas heavily polluted (Ukraine and Baltic Countries), they can be considered significant bioindicators of Cs-137 residual contamination. 73 birds (17 song thrushes and 56 robins) were examined in order to detect Cs-137 in muscles and organs, because the presence of Cs-137 is certainly consequence of Chernobyl accident. No macroscopic lesions were detectable in birds and a low level of radionuclide concentration was found. At the present Cs-137 pollution in Northern part of Italy could not be considered a hazard for the animal and human health.

Correspondence: Daniele Gallazzi - Dip. Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sez. Anatomia Patologica e Patologia Aviare - Università degli Studi di Milano - Via Celoria, 10 - 20133 Milano. E-mail: daniele.gallazzi@unimi.it

Introduzione

In seguito all'incidente di Chernobyl tutta l'Europa ha subito una ricaduta radioattiva più o meno intensa, quindi diventa significativo lo studio della contaminazione residuale di tale incidente nell'ecosistema. A tale proposito si è ritenuto di grande interesse valutare la presenza di Cesio-137 in uccelli migratori, provenienti dall'Europa orientale e probabilmente nidificanti anche nelle regioni circostanti la centrale stessa.

Il presente studio ha preso in considerazione due specie di uccelli insettivori migratori, il Tordo bottaccio (*Turdus philomelos*) ed il Pettirosso (*Erithacus rubecula*). Gli insettivori, proprio per la loro dieta, possono essere considerati come eccellenti bioindicatori (6) della contaminazione da radionuclidi delle zone di nidificazione e, per il Pettirosso, che sverna pure nel sud dell'Europa, anche di quelle di migrazione.

Oltre alla misurazione del Cs-137 nei tessuti degli uccelli consegnati al nostro laboratorio diagnostico, è stata condotta anche un'indagine anatomico-patologica e parassitologica per controllare lo stato di salute degli stessi in quanto, come noto, le radiazioni possono indurre alterazioni tissutali ed uno stato di immunodepressione.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati in totale 73 uccelli, di cui 17 Tordi bottacci abbattuti durante la stagione di caccia dell'autunno 2000 nella provincia di Brescia e 56 Pettirossi che sono stati sequestrati, sempre nella provincia di Brescia, rispettivamente in Val Camonica ed in Val Trompia, perché catturati illegalmente con il metodo dell'"archetto", antico strumento di aucupio, da tempo proibito.

Tutti gli uccelli sono stati sottoposti ad esame necroscopico durante il quale si è potuto determinare: il sesso, lo stato di nutrizione, la presenza di lesioni macroscopicamente rilevabili, l'eventuale presenza di macroparassiti.

Al fine di controllare separatamente i vari organi e tessuti per la determinazione della radio-contaminazione, ogni soggetto è stato

successivamente dissezionato nel seguente modo: apparato gastroenterico, fegato, pancreas, cuore, muscoli scheletrici, rimanente carcassa. I campioni sono stati suddivisi in categorie di peso con riferimento alla massa iniziale della carcassa e rispetto al peso standard della specie. In questo modo sono state scelte, sia per i tordi sia per i pettirossi, quattro categorie di peso.

Nel corso della ricerca si è ritenuto necessario procedere alla raccolta di campioni di terreno e vegetali dai luoghi di cattura dei Pettirossi per rilevare la rispettiva contaminazione residua di Cs-137.

Le matrici prese in considerazione sono state le seguenti: terre superficiali, terre profonde, muschi, acqua corrente. Per le matrici solide i calcoli sono stati fatti in base al peso secco (1).

Le analisi sono state effettuate nel laboratorio centralizzato dei radioisotopi della Facoltà.

Risultati

Dei quattro gruppi di tordi esaminati, solo nel gruppo A, che comprende i soggetti dal peso più lieve, si è rilevata una concentrazione di Cs-137 di 15,2 Bq/kg nel muscolo striato e di 7,3 Bq/kg nelle carcasse e penne.

Nei pool di cuore, stomaco muscolare ed altri visceri non è stata rilevata attività. Unendo tutti i referti dei gruppi negativi il risultato è rimasto ugualmente negativo. Ciò in pratica significa l'assenza anche di una minima concentrazione di radionuclidi.

Per quanto concerne i Pettirossi v'è da dire che i vari gruppi, esaminati separatamente, sono sempre risultati con concentrazione non rilevabile, così come i pool di stomaci muscolari e visceri. Riunendo però cuori e muscoli di tutti i gruppi si è ottenuto un valore di 1,6 Bq/kg e, per quanto riguarda carcasse e penne, tale valore è risultato di 1 Bq/kg. E' evidente che la bassa contaminazione delle matrici dei quattro gruppi si è svelata solo accumulando tutti i campioni di carcasse e muscoli, mentre i visceri sono risultati negativi comunque.

I campionamenti ambientali eseguiti in Val Trompia hanno dato per la terra superficiale una contaminazione di Cs-137 pari a 100 Bq/kg, mentre

nella terra profonda non era rilevabile alcuna attività. Per quanto riguarda i muschi è stata rilevata un'attività media di 136,6 Bq/kg. Le acque non risultavano contaminate.

I valori rilevati in Val Camonica sono stati di 91,9 Bq/kg per la terra superficiale, 1,6 Bq/kg per la terra profonda. Per i muschi 85 Bq/kg. Anche in Val Camonica le acque non risultavano contaminate.

Per quanto concerne lo stato sanitario e la carica parassitaria non sono state evidenziate alterazioni di rilievo.

Discussione

Occorre innanzi tutto premettere che i sopra citati risultati vanno interpretati tenendo presente la biologia, l'alimentazione e le abitudini degli uccelli considerati.

Per quanto concerne i tordi si sa che migrano alle nostre latitudini in autunno per spostarsi poi celermente in zone ancora più calde. La loro permanenza nel nord Italia è quindi breve. E' lecito pensare che il gruppo di tordi che presentava una lieve contaminazione di Cs-137 (15,2 Bq/kg) avesse assunto tale radionuclide assieme al cibo in altri luoghi. Il basso livello di contaminazione ed il veloce metabolismo degli uccelli non permettono di desumere con certezza che essi avessero assunto i radionuclidi dalla zona sita intorno a Chernobyl, o che vi provenissero. Certamente però, tenuto conto degli areali di nidificazione, provenivano da zone del nord Europa contaminate, quali le pianure dell'Ucraina e dei Paesi baltici (2).

I Pettirossi, invece, sono comuni in tutta Europa, ma anch'essi tendono a svernare nelle zone più temperate. La cattura dei soggetti presi in esame nella seguente ricerca era avvenuta nel tardo autunno, probabilmente dopo qualche settimana di permanenza nelle nostre valli. In ogni caso questi uccelli migrano con tempi più lenti rispetto ai tordi, riposandosi a lungo nei luoghi prescelti. Questa osservazione ha reso indispensabile l'analisi di taluni campioni ambientali nei punti di cattura. Si è constatato così che terre superficiali e muschi di quei luoghi mostravano un livello di contaminazione simile a quello osservato in precedenti ricerche in provincia di Sondrio e di Bergamo in questi ultimi anni (3,4).

E' importante rilevare che, sebbene i singoli gruppi risultassero negativi, le matrici in esame, pur in scarsa quantità, davano però un lieve segnale visibile sul monitor del sistema computerizzato dello spettrometro gamma.

Analizzando insieme i muscoli striati ed i cuori di tutti i gruppi, organi in cui viene concentrato il Cs-137, si è potuto rilevare un'attività sicuramente molto bassa, ma che è stata identificata in 1,6 Bq/kg. Le penne e le carcase mostravano un'attività ancora più bassa, pari a 1 Bq/kg.

Questa bassissima attività presente in maniera omogenea in tutti i Pettirossi fa pensare ad una assunzione recente di Cs-137. Poiché tra gli usuali alimenti di questi uccelli ci sono larve ed insetti tellurici, nonché bacche, è possibile che tale assunzione sia avvenuta nelle valli di cattura. In recenti pubblicazioni si è appurato infatti che nelle valli bergamasche e valtelinesi la contaminazione di Cs-137 è intorno a circa 100 Bq/kg (3,4). Anche le concentrazioni da noi rilevate in Val Trompia e in Val

Camonica nelle terre superficiali (circa 100 Bq/kg) giustificano pienamente e quasi confermano come recente la contaminazione dei Pettirossi. Infatti secondo Trenti (1987) l'assunzione di radionuclidi diminuisce di un fattore 10 ad ogni passaggio della catena alimentare, per cui in questo caso tale rapporto sembrerebbe perfettamente rispettato.

Rispetto alle rilevazioni effettuate negli anni immediatamente seguenti l'incidente (6), i risultati da noi ottenuti dimostrano che i tempi di dimezzamento biologico seguono un andamento più complesso rispetto al semplice dimezzamento fisico.

Per quanto concerne lo stato sanitario dei soggetti esaminati, sia i Tordi sia i Pettirossi non presentavano delle lesioni riferibili a patologie croniche o da immunodepressione. Il dato non desta meraviglia, in quanto, trattandosi di soggetti viventi allo stato libero e che erano in corso di migrazione, è ovvio che si riferisce ad animali che erano in grado di sopportarne la durezza.

In sintesi possiamo dire che da un punto di vista della salute pubblica i valori di radiocontaminazione rilevati non si possono considerare un pericolo, anche se questi animali rientrassero nella catena alimentare, né tanto meno possono essere considerati apportatori di contaminazione ambientale, nel senso che qualora anche gli animali morissero in loco non ne modificherebbero la radioattività.

Per quanto riguarda la salute degli uccelli stessi i valori rilevati ammettono solo degli effetti stocastici (cioè senza soglia). Nel caso di provenienza dalle zone contaminate dall'incidente di Chernobyl è lecito pensare che durante la permanenza in tali zone la loro radiocontaminazione sia stata di maggiore entità e quindi abbia rappresentato un maggior pericolo per la loro salute. Ciò perché gli effetti biologici delle radiazioni sono dose-proporzionali. Se invece la contaminazione osservata ha rappresentato il massimo della dose ingerita non si può escludere comunque un danno, anche se di entità di poco superiore agli effetti dovuti all'esposizione della radioattività naturale.

In ogni caso la presenza di Cs-137 nell'ambiente è traccia inequivocabile di una contaminazione dovuta all'uomo, in quanto questo radionuclide è un prodotto di fissione e non esiste in natura.

Bibliografia

1. Cucchi G., Amato V. "Metodologia di misura della contaminazione radioattiva gamma su matrici ambientali". Seminario ANPEQ-ENEA. Bologna, 04.06.1987.
2. Facchini U. "Evento Chernobyl". Edizioni CUSL, 1995
3. Rimoldi E. M., Cavallone E., Di Giancamillo M., Brambilla P. "Determinazione del Cs-134 e Cs-137 in matrici alimentari e ambientali nel territorio di Serina in Lombardia". Rivista di Scienza dell'alimentazione, 28 (1): 1-9, 1999.
4. Rimoldi E. M., Cavallone E., Bignazzi R., Galimberti M. A., Leonardi L. "Contaminazione residuale da Cs-137 in provincia di Sondrio (Lombardia, Italia)". La Rivista di Scienza dell'Alimentazione, 29 (4), 2000.
5. Trenti F. "Elementi di Medicina Nucleare e radioprotezione Veterinaria" Società editrice Esculapio Bologna, 1987.
6. Vigorita V., Sgorbati G. "Il Tordo bottaccio (*Turdus philomelos*) bioindicatore dell'incidente di Chernobyl" Supplemento alle Ricerche di Biologia della Selvaggina vol. XIX numero unico, 1991.

COMUNICAZIONE 25

NESTED-PCR PER SIEROTIPIZZAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

F. PAGANELLI, P. MASSI, G. TOSI, L. FIORENTINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: virus della bronchite infettiva aviare, sierotipizzazione, nested-PCR, primers.

Nested-PCR for identification serotype of infectious bronchitis virus

Key words: infectious bronchitis virus, serotype differentiation, nested-PCR, primers.

Summary: Infectious bronchitis virus (IBV), a member of the Coronaviridae, is a positive sense, single-stranded RNA virus with a genome size about 27.6 kilobase. IBV causes a highly contagious respiratory infection in chickens. A rapid, highly sensitive and specific method is needed in the differential diagnosis of infections of different serotypes. A nested-PCR method was developed and optimized to detect M41, D274, 793/B e B1648 serotypes of IBV. Nested-PCR analysis using the oligonucleotides specific for sequences within the S2 region of spike (S) gene.

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 aviare (IBV) è una malattia sistemica del pollo, altamente contagiosa, caratterizzata da sindrome respiratoria, cali di deposizione, peggioramento della qualità del guscio e lesioni renali. IBV è considerato il prototipo della famiglia *Coronaviridae*, ha un genoma RNA a singolo filamento costituito da 27600 nucleotidi, che codificano quattro proteine strutturali: la proteina S, le proteine della membrana, M glicosilata e una piccola proteina E, e la proteina N fosforilata del nucleocapside. La proteina S è suddivisa in due subunità polipeptidiche, S1 (525 aminoacidi) che gioca il ruolo maggiore nell'immunità e S2 (625 aminoacidi) che serve da base del peplomero e da ancoraggio alla membrana. La proteina S è risultata estremamente variabile, specie la subunità S1. Numerosi sierotipi noti differiscono, infatti, tra loro per più del 20% dei loro aminoacidi di questa proteina. Ad esempio il sierotipo 793/B nella subunità S1 si differenzia del 20-25% rispetto agli altri sierotipi. Con la *polymerase chain reaction* (PCR) si utilizza proprio la sequenza nucleotidica della subunità S1 per identificare IBV e anche per distinguere alcuni sierotipi noti. Con questo lavoro si è cercato di tipizzare, con tecniche di biologia molecolare, 15 ceppi di IBV identificati nel corso del 2001.

Materiali e metodi

Identificazione del virus

Il campione di partenza, in base alle lesioni presenti nell'animale, è costituito da raschiato tracheale, polmone, rene, tonsille cecali e ovidotto; dopo una omogeneizzazione con PBS antibiotato, viene centrifugato a 3,000 x g e il sovrantante viene utilizzato per l'estrazione e 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 (2). Ottenuto l'RNA si procede alla retrotrascrizione (RT) utilizzando il ProSTAR™ -Kit (Stratagene®, USA), con l'aggiunta del primer XCE2- (Tabella 1) complementare al trascritto. Il prodotto di retrotrascrizione viene utilizzato direttamente nel saggio di PCR eseguito secondo il protocollo della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione i primers XCE1+ e XCE2- che producono un frammento di 464 bp (Tabella 1) (1), identificativo di

IBV. La reazione avviene 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 (*annealing*), 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 1,7% con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

Nested-PCR

Il frammento di 464bp viene utilizzato per una *nested-PCR* con l'aggiunta del primer "reverse" XCE3- e dei primers "forward" BCE1+, DCE1+ e MCE1+ specifici rispettivamente per il sierotipo 793/B, D274 e M41 (Tabella1) (1).

Ogni sierotipo presenta un cDNA di lunghezza specifica: il 793/B corrisponde ha un frammento di 154bp, il D274 di 217bp mentre l'M41 di 295bp. Il cDNA, prodotto con l'RT, va incontro ad un'altra PCR eseguita con i primers S1UNI2+ e XCE2-, seguita da una *nested-PCR* con i primers XCE3- e B1648+ specifici per il sierotipo B1648, caratterizzato da un frammento di 682bp (Tabella 1) (3). La *nested-PCR* viene eseguita secondo lo stesso protocollo della prima PCR e i prodotti ottenuti vengono sempre analizzati grazie a una corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,7%.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2.

Discussione

L'IBV è una vera infezione sistemica e, nonostante l'esteso uso dei vaccini rappresenta ancora uno dei principali problemi sanitari dell'allevamento avicolo. Questo è dovuto alla sua diffusione mondiale, all'estrema variabilità del virus, dovuta in gran parte alla ricombinazione genica e alla pressione selettiva dei vaccini non sempre completamente efficaci. L'indagine epidemiologica deve essere in grado di valutare la presenza dell'infezione mediante l'isolamento o l'identificazione del virus, la sua diffusione (mediante monitoraggi sierologici), ma soprattutto la comparsa di varianti e nuovi sierotipi.

Lo studio dei 15 ceppi di IBV identificati con la RT-PCR, seguiti dalla sierotipizzazione con la *nested-PCR* ha rilevato una elevata prevalenza del sierotipo 793/B. E' importante evidenziare che tutti i gruppi esaminati sono stati vaccinati solo nei riguardi del sierotipo M41, tranne un campione che è stato

vaccinato anche per il sierotipo 793/B. Con la metodica di PCR è possibile identificare il ceppo vaccinale anche dopo 4 settimane dalla vaccinazione, quindi non si riesce a discriminare se si tratta di un ceppo IBV di campo oppure no (1). Questa difficoltà sottolinea maggiormente la necessità che gli esami di laboratorio siano sostenuti da una valutazione dei dati anamnestici, con particolare riguardo al piano vaccinale adottato e al quadro anatomopatologico. Sicuramente la *nested*-PCR è un metodo più specifico e sensibile per la sierotipizzazione di IBV rispetto all'inibizione dell'emoagglutinazione che presenta una cross-reattività anticorpale e quindi una difficoltà nell'interpretazione dei dati.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il personale tecnico della Sezione IZSLER di Forlì.

Tabella 1: Posizione e sequenza dei primers.

Table 1: Position and sequence of primers.

Primer	Sequenza (5'-3')	Gene	Posizione nel gene S
XCE2-	CTCTATAAACACCCTTACA	S1	1168-1193
XCE1+	CACTGGTAATTTTCAGATGG	S1	728-749
XCE3-	CAGATTGCTTACAACCACC	S1	1093-111
BCE1+	AGTAGTTTTGTGTATAAACCA	S1	958-978
DCE1+	ATACAATTATATCAAACCAGC	S1	895-915
MCE1+	AATACTACTTTTACGTTACAC	S1	817-837
S2UNI2+	CCCAATTTGAAAACCTGAACA	S1	31-47
B1648+	ACGGAAGGTGAATCATAACC	S1	415-433

Tabella 2: Casi esaminati.

Table 2: IBV outbreaks examined.

Classe di animali	Età animale	Piano vaccinale	Sierotipo IBV
BROILER	17gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER		H120 a 1gg	M41
BROILER	45gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	33gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
POLLASTRE	38gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	23gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B + M41
BROILER	28gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B + M41
BROILER	37gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	50gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	49gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	40gg.	H120 a 1gg	793/B
CAPPONI	80gg.	H120 a 1gg	793/B
POLLASTRE	45gg.	H120 a 1gg	M41
BROILER	58gg.	H120 a 18gg. + 793/B a 32gg.	793/B + M41
BROILER	47gg.	H120 a 1gg	793/B

COMUNICAZIONE 26

SEGNALAZIONE DI CASI DI CECITA' A PRECOCE INSORGENZA IN PULCINI

M. RONDENA, C. GIUDICE, T. RAMPIN, G. CAMMARATA, R. LUCCHINI

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

Parole chiave: pollo, cecità, retina, RPE, intossicazione

Early onset blindness in chicks – Case report

Key words: chicken, blindness, retina, RPE, intoxication

Summary: Four cases of early onset blindness in chicks are reported. Affected chicks had different origin and their age ranged from 8 to 60 days. Blindness was related to retinal lesions, involving preliminarily RPE. Other clinical signs or gross lesions were not observed. These cases occurred in a restricted geographical area during a short period, without relapses in following flocks. A toxic origin of the blindness is hypothesized.

Correspondence: Tiziana Rampin - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano – Via Celoria 10 – 20133 Milano. Email tiziana.rampin@unimi.it

Introduzione

A partire dalla primavera del 2000 fino all'inizio del 2001 sono stati inviati presso questa struttura, a scopo diagnostico, soggetti che presentavano cecità. Gli animali in cui si manifestava questo fenomeno non mostravano né lesioni oculari evidenti dall'esterno, né sintomatologia riferibile a patologie specifiche, e, solo in qualche caso, mortalità, specie dei soggetti in scadente stato di nutrizione. Dal momento che non è per nulla comune il riscontro di tali manifestazioni nella nostra routine diagnostica e non esistono segnalazioni in bibliografia di patologie di questo tipo, i casi hanno destato subito interesse. Le uniche segnalazioni in bibliografia riguardanti forme morbose che possano causare anche cecità in polli e altri volatili di allevamento si riferiscono a infezioni da *Pasteurella* con lo sviluppo di panoftalmiti (1). Esistono inoltre disordini di natura genetica che portano a cecità nei polli, a tal proposito si ricordano tra gli altri i polli DAM (Smyth/Delayed Amelanotic Mutant line), degenerazioni retiniche delle Rhode Island e dei loro incroci (Rods and Cones/Retinal Dysplasia, Partial Retinal Dysplasia) e delle Withe Leghorn (B line Retinal Dysplasia ed una forma di cecità ereditaria) (2).

Materiali e metodi

I casi studiati riguardano pulcini e pollastre di varia età provenienti da diversi allevamenti appartenenti ad una area geografica abbastanza ristretta, più precisamente la provincia di Varese. In due casi gli animali provenivano da svezzatori, i quali avevano rilevato il problema in diverse partite successive. In un caso si trattava di soggetti femmine di un allevamento di ovaiole con rimonta interna. In un altro caso i soggetti appartenevano ad un allevamento di carattere rurale.

Episodio 1 Allevamento di svezzamento, provincia di Varese. Inviati pulcinotti di due partite rispettivamente di 15 giorni e di 1 mese di età. L'allevatore riferiva di diverse partite in cui si manifesta cecità precoce, riscontrabile già a 15 giorni di vita.

Episodio 2. Allevamento con rimonta interna in provincia di Varese. Inviata 7 pollastre di 60 giorni di età e successivamente altre 10 della medesima partita appartenenti ad un gruppo di 15.000 soggetti. Le pollastre erano allevate in batteria e l'allevatore riferiva che dopo lo spostamento, a 30 giorni di età, di parte delle pollastre dal piano della batteria riscaldato si

verificava una mortalità elevata (3000 soggetti in pochi giorni) tra gli animali che avevano subito lo spostamento. Osservazioni più approfondite, condotte dallo stesso allevatore, mettevano in luce uno stato di cecità delle pollastre, con conseguente incapacità ad alimentarsi dei soggetti trasferiti in gabbie diverse.

Episodio 3. Polli provenienti da un piccolo allevamento rurale della provincia di Varese. Al momento della macellazione l'allevatore si accorgeva che i polli erano ciechi, il veterinario ASL interpellato inviava gli occhi degli animali in esame fissati in formalina.

Episodio 4. Allevamento di svezzamento in provincia di Varese. L'allevatore ha inviato soggetti di pulcini di razza colorata appartenenti a 3 partite diverse, rispettivamente di 74 giorni, 22 giorni e 8 giorni di età. L'allevatore riferiva come ad una settimana di vita si rilevava un rallentamento della crescita degli animali i quali, pur mangiando meno, sembravano sempre alla ricerca di cibo, non sembravano accorgersi di improvvise variazioni di illuminazione (spegnimento improvviso delle luci) del locale e non reagivano al riflesso della minaccia né si spostavano mentre l'allevatore camminava in mezzo a loro.

Esame obiettivo generale e particolare. Agli animali veniva effettuato un esame obiettivo generale per la valutazione dello stato nutrizionale e di salute, il grado di accrescimento corporeo, eventuali alterazioni comportamentali. Un esame obiettivo particolare veniva condotto sull'occhio per la valutazione del grado di ipovisione, la capacità di evitare gli ostacoli, la presenza dei riflessi oculari, di alterazioni morfologiche e per escludere eventuali essudati intraoculari (es.: ipopion, ifema) o altre patologie del cristallino (es.: cataratta).

Esami necroscopico ed istologico. Subito dopo l'eutanasia veniva effettuata la necroscopia durante la quale venivano prelevati gli occhi che venivano fissati in soluzione di Davidson, costituita da una miscela di formalina, etanolo 95°, acido acetico glaciale e acqua distillata, quindi inclusi in paraffina e sezionati a 4 µm di spessore. Le sezioni ottenute venivano colorate con Ematossilina-Eosina. Dell'episodio 3 erano disponibili solo gli occhi prelevati da un collega e recapitati fissati in formalina.

Risultati

Alla visita clinica i pulcini di tutti i gruppi esaminati, mostravano caratteristiche simili; accanto a soggetti

normalmente cresciuti se ne notavano alcuni con ritardi di crescita. All'esame obiettivo particolare dell'occhio in tutti i soggetti esaminati erano assenti alterazioni morfologiche e lesioni oculari esterne, a carico della camera anteriore e del cristallino, ma i volatili mostravano una andatura incerta ed erano incapaci di evitare gli ostacoli posti davanti ad essi, inoltre era assente il riflesso della minaccia. La costante presenza nei soggetti esaminati del riflesso pupillare in reazione allo stimolo luminoso e del riflesso consensuale sull'occhio controlaterale consentiva di escludere lesioni a livello di sistema nervoso centrale e dei nervi ottici e permetteva di formulare la diagnosi di una grave ipovisione.

All'esame necroscopico erano riscontrabili solo segni riferibili a difficoltà ad alimentarsi, quali: stomaco muscolare vuoto, ipotrofia delle masse muscolari e alterazioni scheletriche, come la deformazione a S della carena dello sterno. Non si riscontravano lesioni di rilievo a carico dei visceri toraco-addominali se si escludono due casi nei quali erano riscontrabili rispettivamente una lieve aerosacculite fibrinosa, ed una modesta ipotrofia della Borsa di Fabrizio, comunque non riconducibili direttamente alle lesioni oculari. All'esame macroscopico dell'occhio, effettuato, dopo fissazione, era evidente un distacco retinico multifocale o diffuso in una larga percentuale di occhi esaminati. Istologicamente, erano evidenti alterazioni a carico della porzione uveale posteriore e della retina. Le lesioni più comunemente riscontrate, solitamente bilaterali e di pari gravità, erano rappresentate da ipertrofia dell'Epitelio Retinico Pigmentato (RPE), che presentava rigonfiamento cellulare ed accumulo di pigmento, dapprima in sede citoplasmatica, successivamente, nei casi più avanzati, disperso in ambiente extracellulare tra gli strati retinici esterni (articoli terminali dei fotorecettori). Il progredire delle lesioni dell'RPE conduceva al distacco retinico, multifocale o diffuso, in presenza di zone di atrofia degli articoli terminali, dei fotorecettori e in molti casi anche degli strati interni della retina, fino a sfociare nella formazione di cicatrici corio-retiniche. Uno stato flogistico della coroide posteriore, in grado da moderato a grave, era sempre presente come uveite linfoplasmacellulare. Infiltrati linfoplasmacellulari di lievissima entità erano in qualche caso presenti a livello irideo e dell'angolo corneosclerale. Non si sono potute osservare lesioni negli occhi prelevati dall'episodio 3 perché questi ci sono stati recapitati privi di retina e gravemente danneggiati da errate manualità di prelievo.

Discussione

I pulcini esaminati avevano un'età variabile dagli 8 ai 60 giorni, provenivano da allevamenti di tipologia differente ma riferibili ad una stessa area geografica (la provincia di Varese), appartenevano a linee diverse (ovaiole commerciali, polli colorati da allevamento di tipo rurale) e provenivano da diversi incubatoi. Tutti i casi osservati si sono verificati in un periodo di tempo limitato e negli allevamenti colpiti non si sono verificate recidive nelle rimonte successive. La percentuale dei colpiti veniva stimata dall'allevatore e oscillava tra il

30% (episodio 1) al 100% (episodio 4). Negli gruppi colpiti non erano evidenti patologie di tipo sistemico o infettivo, ma in tutti la cecità era dovuta alle stesse lesioni oculari a carico di retina ed RPE, tali da giustificare la gravità dell'ipovisione denunciata dagli stessi allevatori. Questo fatto ha successivamente impedito agli animali di alimentarsi normalmente determinando rallentamento di crescita e forme carenziali o addirittura, in quei casi in cui gli stessi venivano spostati in gabbie diverse rispetto a quelle delle prime settimane di allevamento, la morte per inedia (Episodio 2). Le alterazioni originano verosimilmente a livello di RPE, in quanto questa struttura risulta avere le lesioni più precoci. L'RPE è un fondamentale supporto per la retina, svolge infatti una funzione trofica (3), che negli uccelli è rivolta soprattutto agli strati più esterni che comprendono i fotorecettori (4). Inoltre concorre nel mantenimento della retina in situ, attraverso i suoi prolungamenti cellulari. Notevole è la specificità e la ripetitività delle lesioni in soggetti dello stesso gruppo, mentre una progressione delle stesse è ipotizzabile dall'esame di gruppi di età diversa. Il meccanismo con cui si sono determinate le lesioni retiniche osservate resta da chiarire, ma sulla base di numerosi dati riguardanti soprattutto l'uomo ed i mammiferi da laboratorio, si può ipotizzare l'azione di sostanze dotate di tossicità specifica per l'RPE (3), tra le quali, ad esempio, vengono segnalate la idrossiclorochina(4), il tamoxifene, il 5'-fluorouracile, la gentamicina, il ganciclovir (5). La sporadicità dei casi, raccolti come già ricordato in una ristretta area geografica, non renderà facile scoprire quale sostanza possa essere responsabile. Sul come questa possa aver raggiunto i gruppi colpiti, la via alimentare ci è sembrata la più probabile. Il tentativo di trovare un elemento comune tra gli allevamenti interessati ha portato alla luce che, nel periodo in questione, almeno 2 degli allevatori in questione hanno utilizzato una medesima partita di soia nella preparazione del mangime somministrato agli animali. In questo senso sono state fatte prove di riproduzione della patologia in pulcini mediante somministrazione della stessa soia, i cui risultati sono attualmente in fase di valutazione.

Bibliografia

- 1 Olson L.D. (1981) Ophthalmia in turkey infected with *Pasteurella multocida*. *Avian Dis*, 25: 423-430
- 2 Gelatt K.N. (1998) *Veterinary ophthalmology*. Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, USA, pagg 1178-1181
- 3 Green W.R.(1996) *Retina in: Ophthalmic Pathology*, vol. II, ed. Spencer W.H., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pagg.667-676 e 874-879
- 4 Jones S. K. (1999) Ocular toxicity and hydroxy-chloroquine: guidelines for screening. *Brit. J. Dermatol.*, 140: 3-7.
5. Mannestrom M, Zorn-Kruppa M., Diehl H, Engelke M., Toimela T., Maenpaa H., Huntala A., Uusital H., Salmine L., Pappas P., Marselos M., mantyla M, mantyla E., Tahti H., (2002) Evaluation of the cytotoxicity of selected systemic and intravitreally dosed drugs in the cultures of human retinal pigment epithelial cells. *Toxicol in Vitro*, 16:193-200

COMUNICAZIONE 27

INDAGINI BIOCHIMICHE CLINICHE IN TACCHINI COMMERCIALI: RISULTATI PRELIMINARI

V. SPAGNOLO, Z. BERNARDI, S. PALTRINIERI

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria,
Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: tacchino, metabolismo, biochimica clinica

Clinical biochemistry in commercial turkeys: preliminary report

Key words: turkey, metabolism, clinical biochemistry

Summary: Biochemical metabolic profiles were evaluated on serum samples from 8 commercial turkey flocks of different ages with or without enteric signs. The purpose was to establish reference values for healthy animals so to find out possible metabolic alterations in affected subjects.

Correspondence: Valentina Spagnolo - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia, Università degli Studi di Milano – Via Celoria 10 – 20133 Milano. Email valentina.spagnolo@unimi.it

Introduzione

Uno dei principali problemi che possono affliggere gli allevamenti avicoli industriali è rappresentato dalle affezioni enteriche, a causa delle ripercussioni che possono avere sulla produzione.

Per quanto riguarda in particolare il tacchino, inoltre, è spesso difficile arrivare ad una precisa diagnosi eziologica. In questa specie, infatti, negli ultimi anni è stato possibile osservare l'insorgenza di forme enteriche già a partire dalle 3-4 settimane di vita, che si protraggono per alcune settimane. Il trattamento farmacologico ha spesso fornito risultati solo parziali, tanto che tali patologie tendono a protrarsi nel tempo, portando ad un lieve aumento di mortalità e di indice di conversione. La sintomatologia risulta caratterizzata da alterazioni comportamentali, produzione di deiezioni decisamente acquose, e scarse o nulle variazioni della temperatura corporea.

Parallelamente alla ricerca di patogeni enterici, qui riferiti in un'altra comunicazione, in considerazione del fatto che le indagini preliminari svolte in tale direzione avevano fornito risultati insufficienti a spiegare la gravità della forma morbosa, è stato ritenuto utile effettuare anche l'esame dei profili metabolici degli stessi soggetti. Una delle possibili ipotesi eziologiche, infatti, riguardava la razione alimentare, forse non del tutto adeguata al tipo di allevamento. Sono dunque state condotte le analisi biochimiche cliniche relative ai profili metabolici proteico, lipidico, glucidico, renale, epatico, pancreatico, muscolare e minerale.

Data l'esiguità della letteratura riguardante tale tipo di indagini in tacchini commerciali, soprattutto se consideriamo che il profilo metabolico può subire modificazioni notevoli, anche all'interno di una stessa specie, in funzione del sesso, dell'età e delle modalità di management dell'allevamento, si è reso necessario creare un gruppo di controllo, formato da soggetti sani, omogeneo anche dal punto di vista dell'età, i cui valori sono stati considerati normali, anche senza il conforto di un riscontro bibliografico.

Materiali e metodi

In un periodo di tempo compreso tra l'aprile 2001 e il febbraio 2002 sono state controllate 8 partite commerciali di cui 4 costituite da soggetti asintomatici e 4 provenienti da allevamenti colpiti dalla sintomatologia enterica. Su alcuni dei soggetti sacrificati per la ricerca dei patogeni enterici sono stati

prelevati campioni di sangue, che è stato prelevato dal cuore o dalla vena alare a seconda dell'età dei soggetti.

Dai campioni ematici, previa centrifugazione, è stato ottenuto il siero necessario per le analisi ematochimiche. Per il presente lavoro tra tutti i risultati ottenuti sono stati utilizzati solo quelli relativi a gruppi tra loro omogenei per età, in modo tale da rendere possibile e significativo il confronto tra sani e sintomatici. In particolare sono stati creati dei gruppi di controllo, di cui 4 composti da soggetti prelevati a tra i 21 e i 23 giorni di vita provenienti da 4 allevamenti asintomatici (gruppi C1/21, n=5; C2/21, n=6; C3/21, n=5; C4/23, n=3) e un altro costituito da animali appartenenti a 3 dei 4 precedenti allevamenti, sottoposti al prelievo all'età di 28 giorni (C/28, n=5 in ciascuno dei 3 gruppi, n_{tot}=15).

Sono stati poi presi in considerazione i risultati relativi agli animali malati nei quali il prelievo era stato fatto ad un'età paragonabile a quella dei gruppi di controllo. Infatti i 4 allevamenti sintomatici sono stati sottoposti a prelievo rispettivamente a 21 (P/21, n=5), a 25 (P1/25, n=6), 26 (P2/26, n=6) e 27 (P3/27, n=6) giorni di vita. I risultati dei gruppi patologici sono stati dunque singolarmente confrontati con quelli dei gruppi di controllo (P/21 versus C1/21, C2/21, C3/21, C4/23 e P1/25, P2/26, P3/27 versus C/28).

In particolare sono stati indagati il metabolismo proteico: (proteine totali e albumine), il metabolismo lipidico (colesterolo e trigliceridi), il metabolismo glucidico (glucosio), la funzionalità renale (acido urico, urea e creatinina), la funzionalità epatica (bilirubina totale, AST, ALT, γ GT, ALP, LDH), la funzionalità pancreatica (amilasi e lipasi), la funzionalità muscolare (CK) e il dosaggio di elettroliti (calcio, fosforo e ferro). Tutte le analisi ematochimiche sono state condotte con analizzatore automatico (Cobas Mira, Roche), utilizzando reattivi forniti dalla ditta Sigma Diagnostics. L'analisi statistica per il confronto tra i gruppi è stata effettuata con test ANOVA.

Risultati e discussione

L'analisi dei risultati risulta complicata dalla mancanza di dati disponibili in letteratura riguardanti i ranges di riferimento non solo per il tacchino commerciale in particolare, ma anche per la specie del tacchino (*Meleagris gallopavo*) in generale.

Il confronto statistico dei risultati relativi a tre gruppi di animali provenienti da allevamenti asintomatici sottoposti a prelievo a 28 giorni di vita ha evidenziato che la maggior parte dei parametri non mostra differenze significative, fatta eccezione per creatinina e glucosio, che presentano comunque valori compresi entro i limiti di riferimento di altre specie aviari, e per alcune attività enzimatiche, considerate comunque trascurabili in quanto si tratta di enzimi notoriamente caratterizzati da elevata variabilità. Per questi motivi si è giudicato opportuno riunire i 3 gruppi di animali sani in un unico gruppo di controllo (C/28).

I risultati ottenuti dai campioni di ciascuno dei 3 allevamenti con manifestazioni enteriche, in cui il prelievo era stato fatto ad un'età simile a quella del gruppo C/28 (gruppi P1/25, P2/26 e P3/27), sono stati singolarmente confrontati con il C/28.

I risultati ottenuti portano alle seguenti considerazioni:

- le proteine totali e il calcio mostrano costantemente livelli più elevati rispetto al gruppo (C/28), forse in rapporto alla disidratazione legata ai fenomeni enterici;
- il gruppo P1/25 mostra valori di creatinina e urea più elevati rispetto al gruppo C/28, ma con un'alta deviazione standard, verosimilmente legata ai risultati di un singolo soggetto; nello stesso gruppo il valore dell'acido urico non si differenzia però da quelli degli altri gruppi;
- i parametri epatici e quelli energetici (GPT, γ GT, bilirubina totale e trigliceridi) risultano più elevati nel gruppo P1/25;
- anche il fosforo inorganico presenta valori più elevati nel gruppo P1/25, forse in relazione a fenomeni di insufficienza renale

Sono stati inoltre confrontati tra loro i risultati relativi ai prelievi effettuati nei 4 allevamenti di soggetti non sintomatici tra i 21 e i 23 giorni di vita (gruppi C1/21, C2/21, C3/21 e C4/23). Solo le attività enzimatiche sono risultate non significativamente differenti tra i 4 gruppi, nonostante le notevoli differenze riscontrabili nei loro valori medi, probabilmente legate ad elevata variabilità individuale. Tutti gli altri parametri sono invece risultati spesso molto differenti nei vari gruppi, per cui non si è ritenuto opportuno, in questo caso, riunirli in un unico gruppo di controllo, come nel caso dei prelievi effettuati a 28 giorni.

Più in dettaglio, nel gruppo C2/21 si evidenziano i valori di proteine totali ed albumine più elevati, legati ad un possibile stato di disidratazione. Sono da segnalare notevoli discrepanze nel comportamento dei parametri legati alla funzionalità renale (urea, creatinina e acido urico), anche se tali risultati sembrano rientrare in limiti di valori considerati normali per altre specie aviari; solo nei gruppi C1/21 e C2/21 si nota un parallelismo tra l'acido urico e l'urea, che suggerisce una possibile sofferenza renale in tali soggetti; negli altri gruppi solo occasionalmente si osservano valori che si discostano fortemente da quelli medi, verosimilmente in rapporto ad elevata variabilità individuale.

I parametri riferibili al metabolismo energetico mostrano variazioni significative, ma entro limiti contenuti, mentre si osservano alterazioni notevoli dei valori del calcio e del fosforo, che appaiono più bassi nel gruppo C1/21 rispetto agli altri, e del ferro, più basso nei gruppi C2/21 e C3/21.

I 4 gruppi, considerate le differenze significative nei valori relativi a quasi tutti i parametri esaminati, sono stati quindi mantenuti distinti e singolarmente confrontati con l'unico gruppo di soggetti sintomatici (P4/21) prelevati a 21 giorni.

Il gruppo patologico (P4/21) mostra valori di proteine totali ed albumine simili a tre dei quattro gruppi di controllo (C1/21, C3/21 e C4/23), ma non a quelli di C2/21, che presenta valori più elevati. Sono inoltre da segnalare i valori elevati riferiti ad urea, creatinina ed acido urico, verosimilmente legati a sofferenza renale.

Nel gruppo P4/21 si osservano sensibili variazioni degli altri parametri solo in confronto al gruppo C2/21, cioè quello i cui valori si discostano fortemente da quelli degli altri gruppi di controllo.

In mancanza di un supporto bibliografico di riferimento possiamo ritenere i risultati da noi ottenuti solo preliminari. Infatti, bisognerebbe disporre di una casistica più consistente, in modo tale da formare dei gruppi di controllo di numerosità adeguata alla individuazione di ranges di riferimento relativi ai singoli parametri e alle diverse classi di età. Solo in questo modo sarebbe possibile disporre di dati con cui confrontare i risultati ottenuti in allevamenti che richiedono un controllo sanitario a tutto campo. Senza valori di riferimento non si può individuare, cioè, l'eventuale presenza di alterazioni metaboliche, che possono avere ripercussioni anche notevoli sulla produttività dell'allevamento.

Bibliografia

1. Krista M., Jackson S., Mora E.C., McDaniel G.R., Patterson R.M. (1978) Blood Plasma Constituents in 14-Week Old Hypertensive and Hypotensive Strains of Turkeys. *Poultry Science*, n.57(2): 1022-1026.
2. Isar O., Avram N., Costache M., Voicu G., Radu C., Boian D., Raileanu M. (1990) Haematology and Blood Chemistry Reference Values in Turkey Broilers. *Zootehnie Si Medicina Veterinara*, n.40(2): 39-45.
3. McCorkle F.M., Edens F.W., Simmons D.G. (1985) *Alcaligenes Faecalis* Infection in Turkeys: Effects on Serum Corticosterone and Serum Chemistry. *Avian Diseases*, n.29(1): 80-89.

COMUNICAZIONE 28

INDAGINE SULLE CAUSE DI MORTALITA' IN GABBIA DI BROILER LEGGERI ALLA VISITA PRE-MACELLAZIONE

S. FERRARINI¹, F. MUTINELLI², V. POLI³

¹ Veterinario Ufficiale, ASL n. 6, Vicenza; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD);

³ Direttore S.I.A., ASL n. 6, Vicenza

Parole chiave: broiler leggeri, mortalità in gabbia, macello avicolo, visita pre-macellazione

Cage mortality in light broilers at slaughterhouse

Key words: light broiler, cage mortality, poultry slaughterhouse, pre-slaughter inspection

Summary: 136,498,594 light broilers were examined at slaughterhouse in a 6-year survey on the causes of cage mortality during 1996-2001. The total mortality was 0.23% and the sanitary condemnation amounted to 0.98%. The role played by season, cage density, transportation and waiting time at the processing plant were considered. The possible correlation with the sanitary condemnation was also investigated. Preventive measures aiming at reducing the negative effects of unfavourable weather conditions and the duration of the transport, other than a correct implementation of pre-slaughter fast and an adequate cage density were evaluated. Finally, the role of the official veterinary surgeon who is responsible for monitoring cage mortality at slaughterhouse and for the identification of the possible causes in the productive cycle has also been considered.

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

Introduzione

La mortalità del broiler osservabile durante la visita pre-macellazione costituisce una grave perdita economica (1,2,3,4,5), coinvolgendo a vario titolo più figure professionali e tra queste, in particolare, l'allevatore, il trasportatore, il responsabile del macello ed il Veterinario Ufficiale. Quest'ultimo in considerazione delle norme che riguardano la protezione degli animali durante il trasporto (D. Lgs. 388/98), la protezione durante la macellazione o l'abbattimento (D. Lgs. 333/98), deve procedere a regolari controlli durante la visita pre-macellazione, come disposto anche dal cap.VI, punto 28, D.P.R. 495/1997. Scopo dell'indagine è stato valutare la mortalità in gabbia alla visita pre-macellazione in un macello di broiler, nel periodo compreso tra il 1996 e il 2001. Sono stati presi in considerazione la tipologia leggera del broiler (cosiddetto da "rosticceria"), a prevalente pigmentazione cutanea gialla, con età di macellazione di 35-38 giorni ed un peso compreso fra 1.650 e 1.780 g.

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta in uno stabilimento specializzato nella macellazione di broiler leggeri, medi, pesanti, galline ovaiole leggere, riproduttori pesanti e faraone. Su tutte queste categorie commerciali sono stati eseguiti controlli alla visita pre-macellazione relativamente alle condizioni generali (stato di sofferenza, maltrattamenti, stress da trasporto ecc.) ed allo stato clinico (presenza di patologie in fase acuta). E' stato inoltre effettuato un controllo documentale relativo all'attestazione sanitaria dei singoli gruppi (allegato IV D.P.R. 495/97), alla dichiarazione di scorta sull'uso del farmaco (D. Lgs 118/92, art.14) e a conclusione la visita ispettiva post-mortem con il giudizio d'idoneità al consumo umano. I controlli al macello ai fini dell'indagine hanno riguardato in particolare i broiler leggeri per un periodo di sei anni (1996-2001). In questo periodo d'indagine è stato eseguito un controllo costante sulla mortalità in gabbia durante la visita pre-macellazione con rilevazione dei dati. Sono stati inoltre eseguiti a campione indagini necroscopiche ed accertamenti

diagnostici di laboratorio (indagini microbiologiche e istopatologiche). Infine ogni gruppo di volatili è stato sottoposto ad un'accurata visita ispettiva *post-mortem*. La rilevazione delle cause di mortalità nei singoli gruppi di broiler ha consentito la definizione di alcuni parametri ritenuti sostanziali al fine di una corretta interpretazione dei risultati. Le possibili cause di mortalità sono state registrate e confrontate con il periodo dell'anno, la distanza tra l'allevamento ed il macello, il numero di soggetti per gabbia, il tempo intercorso tra l'arrivo e la macellazione e le cause di scarto sanitario. Particolare attenzione è stata rivolta al costante monitoraggio delle condizioni di manutenzione e d'igiene dell'area di sosta (protezioni dalle intemperie, presenza e uso di ventilatori mobili e fissi, sistemi di pulizia e disinfezione, ecc.), così come a quello degli automezzi. Le gabbie modulari utilizzate per il ritiro dei volatili sono state controllate sia nella fase di lavaggio e disinfezione sia in quella d'attesa o di stazionamento, nonché nell'area di sosta al loro arrivo al macello.

Risultati

Nei sei anni di indagine sono stati conferiti al macello 136.498.594 broiler leggeri ed è stata registrata una mortalità media pari allo 0,23%, con uno scarto sanitario dello 0,98%. La mortalità rilevata è risultata compresa fra 0,1% (valore riferito ad un gruppo di 6.081 broiler) e il 6,5% (valore riferito ad un gruppo di 29.728 broiler). La mortalità è risultata maggiore nei mesi più caldi e più freddi (Figura 1). Questi valori sono stati interpretati per quanto riguarda i mesi estivi come una risposta alla sensibilità e sofferenza dei volatili alle temperature elevate, così come ad alti valori di umidità relativa; mentre per quanto concerne i mesi invernali le patologie respiratorie profonde e l'ascite sono risultate responsabili dirette di mortalità durante il trasporto o nell'area di sosta. La cattura, così come il trasporto al macello e le variazioni climatiche sono all'origine di stress che, in soggetti già defedati, può essere causa di mortalità all'arrivo al macello. Le cause di mortalità rilevate nel corso dell'indagine sono state: colpo di calore, soffocamento, traumatismi da carico, assideramento,

sogetti caricati morti, mortalità spontanea e mortalità conseguente a patologie infettive e non. Le osservazioni eseguite hanno consentito di evidenziare una mortalità cosiddetta "fisiologica" (generalmente è rilevabile in tutti i gruppi di volatili), così definita perché determinata dalle operazioni di cattura e ingabbio e caratterizzata da traumi importanti, schiacciamenti, rottura di vasi od organi vitali e conseguenti emorragie interne. Questa causa di mortalità è stata osservata in ragione dello 0,1-0,9%. Il colpo di calore come il soffocamento sono fra le cause di mortalità più tipiche della stagione calda. Il colpo di calore è stato osservato in modo sporadico (in alcuni casi fino al 3,5%) ed è legato in particolare a soste obbligate dell'automezzo (es. a seguito di incidenti stradali), il soffocamento invece ha fatto registrare valori considerevoli (dallo 0,18% al 4% e più) in concomitanza di temperature elevate con elevato tasso di umidità ed un elevato numero di soggetti per gabbia. La sofferenza dei volatili nella stagione calda è risultata maggiore se confrontata alle temperature rigide dei mesi invernali. In alcuni rari casi l'assideramento è stato responsabile di mortalità all'arrivo (valori non superiori allo 0,2%). Generalmente, la mortalità era riconducibile a soggetti arrivati bagnati al macello e che sostavano alcune ore prima della macellazione, in zone dell'area di sosta scarsamente protette dalle correnti fredde. In alcuni casi la mortalità osservata alla visita pre-macellazione era attribuibile al carico di soggetti che in allevamento erano già morti per diverse cause (es. traumi, asciti, soffocamento, ecc.). Lo stato di grave alterazione cadaverica, a prescindere dalla stagione, ha reso in questi casi agevole l'identificazione della causa di mortalità (mai superiore allo 0,84%). La mortalità spontanea è stata accertata in tutti i casi in cui il quadro anatomopatologico era riconducibile ad un'insufficienza cardiocircolatoria acuta. Questo riscontro ha riguardato essenzialmente i broiler pesanti, più raramente i broiler leggeri. In questo caso la mortalità riguardava alcuni soggetti in ottimo stato d'ingrassamento e con performance superiori alla media del gruppo. La mortalità dovuta a patologie infettive e non (compresa fra 0,1 e 0,7%) è stata oggetto di analisi soprattutto durante la stagione più fredda con riscontro di gravi casi di polisierosite o ascite. Nell'ambito del controllo della mortalità si è valutata anche la possibile correlazione con lo scarto sanitario. Questo aspetto è risultato il più discordante poiché nel valore complessivo relativo ai singoli mesi del periodo d'indagine non vi è sempre una correlazione tra mortalità e scarto sanitario, mentre ciò è più facilmente rilevabile quando l'osservazione riguarda singoli gruppi di broiler. Anche la distanza dal macello, come il tempo tra l'arrivo e la macellazione, sono stati oggetto di studio. Di ogni gruppo è stata considerata la distanza dal macello stabilendo tre tipologie: <70 km, da 70 a 150, >150. Il 92% dei gruppi controllati era ubicato ad una distanza inferiore ai 150 km dal macello, con un tempo di percorrenza compreso tra venti minuti e tre ore. L'analisi dei dati raccolti non ha evidenziato un incremento della mortalità tale da giustificare una possibile correlazione. Talvolta per distanze superiori si è riscontrato un aumento della mortalità, soprattutto quando il tempo intercorso tra l'arrivo e la macellazione era risultato elevato (10-12 ore).

Conclusioni

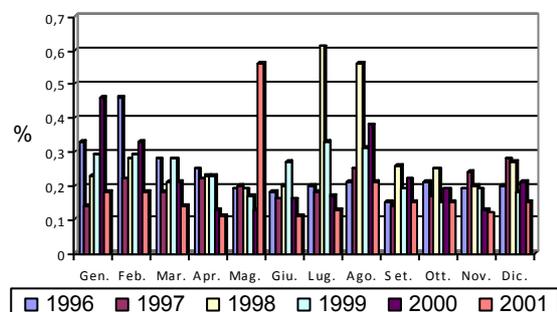
L'indagine condotta nell'arco di sei anni (1996-2001) e mirata ad evidenziare l'incidenza e le cause più frequenti di mortalità nel broiler leggero al macello ha evidenziato una situazione in continua evoluzione. La mortalità complessiva nei sei anni è risultata in calo (con esclusione del 1998 caratterizzato da temperature estive più elevate). Le misure preventive adottate, dirette alle diverse fasi del ciclo produttivo (allevamento, fase di programmazione dei ritiri, trasporto e macello), hanno contribuito a ridurre la perdita di soggetti che incide notevolmente sul bilancio dello stabilimento di macellazione e più in generale sulle diverse componenti della filiera. Nel caso specifico, le perdite riguardano l'allevatore per i costi ed il mancato guadagno, la ditta soccidante per i costi per kg di carne non compensato, per il trasporto, per lo smaltimento delle carcasse come materiale ad alto rischio, per l'impatto ambientale e, non da ultimo, per le eventuali infrazioni alle norme vigenti in materia di protezione degli animali (D. Lgs. 532/1992, D.P.R. 495/1997, D. Lgs. 333 /1998, D. Lgs. 388/1998).

Bibliografia

1. Barontini F., Rossi G., Gaspari P., Mani P. (1999). Indagine sulle cause di mortalità pre-macellazione del broiler. Atti IX Convegno Nazionale AIVI 289-293.
2. Ferrarini S. (2002). Indagine sulla mortalità in gabbia dei broiler alla visita pre-macellazione. Tesi di Specializzazione in Patologia e tecnologia delle specie avicunicole e della selvaggina allevata. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano.
3. Gregory N.G., Austin S.D. (1992). Causes of trauma in broiler arriving dead at poultry processing plants. Vet. Rec. 131, 21, 501-503.
4. Mani P., Rossi G., Barontini F., Gaspari P., Taccini F. (2000). Correlazioni fra cause di esclusione e patologie riscontrate all'esame anatomoistopatologico in broilers oggetto di scarto sanitario al macello. Atti XXXVIII Convegno SIPA, La Selezione Veterinaria 8-9, 725-732.
5. Yogaratnam V. (1995) Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. Vet Rec 137, 9, 215-217.

Figura 1. Mortalità in gabbia mensile riscontrata in broiler leggeri al macello nel periodo 1996-2001.

Figure 1. Monthly cage mortality in light broilers at slaughterhouse during 1996-2001.



COMUNICAZIONE 28

EFFETTI IN CAMPO DEL FORMYL SC[®], UNA MISCELA DI ACIDI MICROINCAPSULATI, SU OVARITI E COLISETTICEMIA NELLA GALLINA OVAIOLE

S. BERTUZZI¹, D. MATTEUCCI²
¹SODA Feed Ingredients Ltd, IRELAND
²Libero professionista

Parole chiave: acidi organici, colisetticemia, galline ovaiole

The field effect of FORMYL SC[®], blend of micro-encapsulated acids, on egg peritonitis and colisepticaemia in layer hens

Key words: organic acids, colisepticaemia, layer hens

Summary: A field trial was conducted to investigate the effect of dietary supplementation of FORMYL SC[®], at the dose of 5 kg/ton for 21 days on colisepticaemia with reproductive organs signs caused in a Northern Italy farmer of layer hens. The blend of microencapsulated acids reduced completely the mortality caused by E. coli.

Correspondence: Stefano Bertuzzi - SODA Feed Ingredients Ltd - 9 Deanscourt, Christchurch Square, Dublin 8, IRELAND -. Email mail@soda-ingredients.com

Introduzione

Gli acidi, in virtù della loro acidità, hanno un'azione antagonista nei confronti dei microrganismi intestinali. Numerose prove in vitro hanno evidenziato la loro azione antibatterica (2, 3), ma il trasferimento di questa loro capacità in vivo risulta possibile solo con l'utilizzo di appropriate tecnologie.

Fino a pochi anni fa, il meccanismo di azione nella nutrizione animale si basava esclusivamente sulla acidificazione a livello gastrico che provocava effetti positivi sulle performance (8), effetti sanitari (4) e risposte antibatteriche (1). Tuttavia i cosiddetti acidi organici liberi, anche in notevoli quantità (1-2%), sono rapidamente neutralizzati nel tratto iniziale dell'intestino tenue, per l'azione tamponante effettuata dal pancreas. Inoltre l'utilizzo di grandi quantità di acidi liberi può provocare un eccesso di acidità nello stomaco che può causare fenomeni di acido tolleranza nei confronti di alcuni microrganismi quali E. coli, salmonelle e clostridi.(9).

Alla luce di utilizzo notevole sia in campo che in lavori sperimentali (11) dell'acido formico il settore R&D di SODA Feed Ingredients Ltd ha predisposto una miscela di acido formico (28%) e acido citrico (10%) protetti da una matrice "attiva" grassa.

La matrice di protezione consente:

- 1) alla miscela di essere maggiormente attivo come acidificante e conservante per i mangimi in quanto favorisce un rilascio continuato;
- 2) assicura anche grande stabilità agli ingredienti attivi del microgranulo perciò non vi sono danni per gli altri additivi acido-sensibili presenti nel mangime quali ad esempio la vitamina A;
- 3) blocca la volatilità dell'acido formico che così resta completamente disponibile per la sua azione battericida, garantendo una perfetta prevenzione da inquinanti batterici che metterebbero a rischio la buona riuscita dell'allevamento. Il controllo sullo sviluppo dei batteri si estrinseca sia attraverso una riduzione prolungata di pH sia attraverso l'attività anionica del formico. L'acido formico infatti penetra all'interno della cellula batterica impedendone la moltiplicazione (10).

Questo microgranulo (Figura 1) ottenuto attraverso l'utilizzo di temperature molto basse (-60° C) risulta essere facile da usare, molto elastico e resistente alle alte temperature.

In precedenti ricerche l'utilizzo di miscele di acidi organici e inorganici protetti nel pollo da carne (OVIGRAM[®]) e nel tacchino da carne (FORMYL[®]) ha mostrato nel primo caso una riduzione della colonizzazione della Salmonella kedougou (6) e una attività simile alla flavomicina (5) e nel tacchino una riduzione dei batterici patogeni (7).

Lo scopo di questa prova di campo era di verificare l'azione di una miscela di acido citrico e acido formico (FORMYL SC[®]), alla dose di 5 kg/ton, su galline in piena deposizione, affette da colisetticemia con lesioni all'apparato riproduttore.

Materiali e metodi

Dati di campo: In un capannone di 45.000 galline ovaiole, ceppo Lohmann, di un allevamento del Nord Italia, all'età di 22 settimane si verifica un aumento della mortalità. All'esame anatomico-patologico in campo e in sala di necropsia si evidenziano lesioni all'apparato riproduttore (ovariti, peritoniti fibrinose), al fegato (periepatite fibrinosa) e alla milza (splenomegalia).

Esami di laboratorio: L'esame batteriologico, effettuato alla sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, è stato allestito da ovaio, milza e fegato prelevati dalla sede necroscopica degli animali conferiti al laboratorio con i medesimi sintomi anatomico patologici.

Sono stati impiegati Agar sangue Hektoen Enteric Agar. Le piastre seminate sono state incubate a 37°C per 24 ore. Le colonie sospette sono state tipizzate mediante enterotube.

Al termine dell'esame batteriologico si è isolato un ceppo di E. coli setticemico.

Azione in campo: Tutto il capannone di 45.000 animali riceve a 23 settimane di età per 21 giorni, un mangime integrato con 5 kg/ton di una miscela di acido formico e acido citrico microincapsulato (FORMYL SC[®])

Risultati

Il capannone al momento dell'inizio dell'integrazione presentava una mortalità dello 0,37%.

Al termine dell'integrazione del mangime (21 giorni dopo) il gruppo presenta una mortalità dello 0,17% (Figura 2), inferiore del 36,94% rispetto alla percentuale iniziale di mortalità.

Inoltre tutti i soggetti morti esaminati alla fine del periodo di integrazione e nei giorni successivi non presentano più lesioni riferibili a colisetticemia.

Discussione

L'utilizzo della miscela protetta di acidi organici denominata FORMYL SC[®], alla dose di 5 kg/ton per 21 giorni, ha permesso la piena risoluzione dei problemi causati da una colisetticemia in galline commerciali in deposizione, non solo facendo diminuire la percentuale di mortalità (-36,94%), ma risolvendo completamente i segni clinici e anatomico patologici della colisetticemia.

Bibliografia

1. Cherrington C.A. et al. (1991) Advances in microbial physiology, 42, 87-108.
2. Cox N.A., McHan, F. and Bailey, J. S. (1994) - Effect of butyric or lactic acid on the in vivo colonization of Salmonella typhimurium J. Appl. Poultry Res. 3: 315-318.
3. Ducatelle R.V.A., Van Immerseel F., Cauwerts K., Janssens G., De Smet I., De Buck J., Haesebrouck F (2001) – Proc. 13th Eur. Symp. Poult. Nutr., oct. 2001 Blankenberge, Belgium, pp 90-97.
4. Hall et al., (1990) Veterinary record, 126:12, 297.
5. Huyghebaert G. (2002) Proc 11th European Poultry Conference, 6-10 september, Bremen Germany. Arch. Geflügelk, 66, 108.
6. Manfreda G., De Cesare A. (2000) Proc. XXI World's Poultry Congress, Montreal, Canada, August 20-24.
7. Manfreda G., Bertuzzi S., De Cesare A. and Cerchiarì E. (2001) Proc. 13th Eur. Symp. Poult. Nutr., oct. 2001 Blankenberge, Belgium, pp 296-7.

8. Patten J.D., Waldroup P.W. (1988) Pou. Sci., 67, 1178-82.
9. Small P. et al. (1994) Journal of Bacteriology, p.1729-1737.
10. Van der Wielen P.W., Biesterveld S., Notermans S., Hofstra H., Uurlings B.A., Van Knapen F. (2000) – Appl. Environ. Microbiol., 66, 2536-40
11. Waldroup A., Kaniawati S., Mauromoustakos A. (1995) – J. Food Prot., 58, 482-489.

Figura 1: Immagine di FORMYL SC[®] al microscopio.
Figure 1: Microscopic picture of FORMYL SC[®]

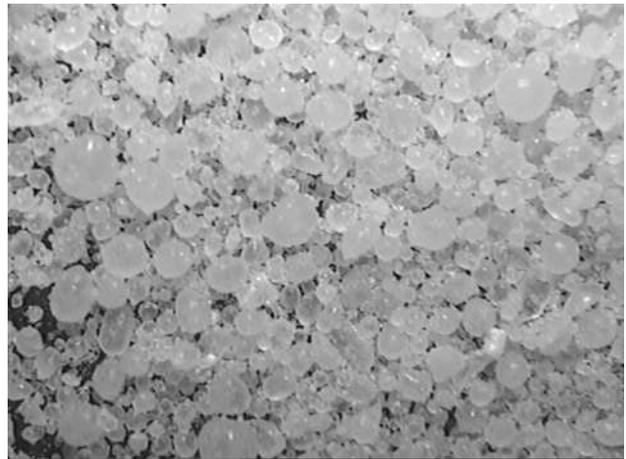
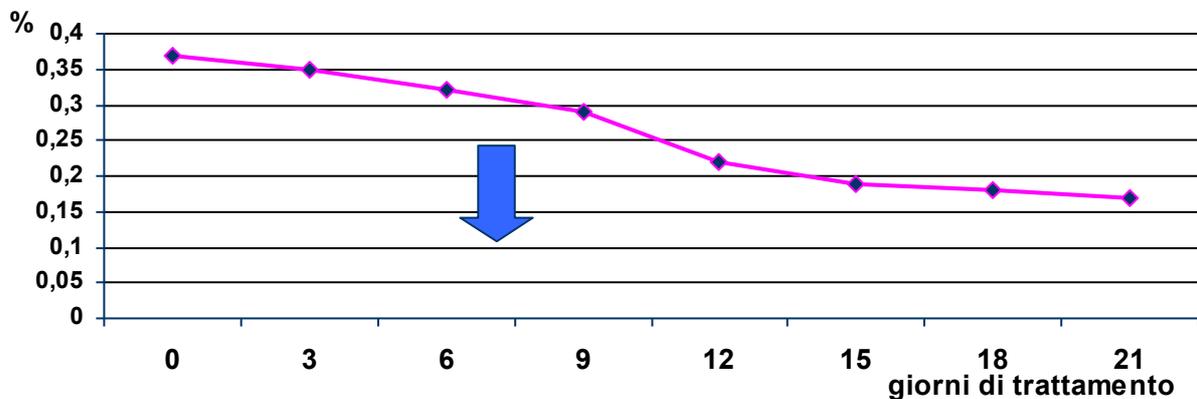


Figura 2: Andamento della mortalità nel periodo di integrazione con FORMYL SC[®] alla dose di 5 kg/ton.
Figure 2: Trend of mortality in supplemented period with FORMYL SC[®] at the dosage of 5 kg/ton.



COMUNICAZIONE 30

ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI REOVIRUS IN CORSO DI SINDROME DA MALASSORBIMENTO NEL BROILER

G.TOSI, P.MASSI, F.PAGANELLI, A.LAVAZZA
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Parole chiave: reovirus, sindrome da malassorbimento, broiler.

Isolation and identification of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in broiler

Key words: avian reovirus, malabsorption syndrome, broiler.

Riassunto: viene descritto un caso di grave sindrome da malassorbimento osservato in un gruppo di broiler fin dai primi giorni di vita. La patologia provocava gravi conseguenze sulle performances produttive e persisteva per tutto il ciclo di allevamento. Le indagini di laboratorio portavano all'isolamento di un ceppo di reovirus successivamente classificato nel gruppo degli ERS ("enteric reovirus strains"), analogamente a ceppi isolati recentemente in altri paesi europei ed extra-europei e responsabili di quadri patologici sovrapponibili a quello descritto nel presente lavoro.

Summary: A severe outbreaks of malabsorption syndrome in broiler is described. The disease caused enteritis and growth retardation during the entire productive cycle. A reovirus strain was isolated from affected broilers. The isolated virus was identified as an ERS (enteric reovirus strain) similar to other avian reovirus isolated in different countries recently.

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

I reovirus aviari vengono associati, nel broiler, ad una serie di patologie tra cui l'artrite-tenosinovite virale e la sindrome da malassorbimento (SMA) (2). Quest'ultima comprende una serie di quadri clinico-patologici ai quali vengono attribuiti, dagli autori anglosassoni, denominazioni diverse ("runting-stunting syndrome", "wet litter syndrome", "cloacal pasting"). Il ruolo dei reovirus aviari come agenti eziologici primari della SMA è controverso. Recentemente in vari paesi europei ed extra-europei sono stati isolati, nel corso di SMA, ceppi di reovirus successivamente identificati come ERS ("enteric reovirus strains"). Da alcuni di questi ceppi è stata ottenuta la riproduzione sperimentale della malattia (4). Durante la prima parte del 2002 sono stati osservati, nel nostro paese, diversi episodi di forme enteriche e di SMA responsabili di gravi peggioramenti delle performances produttive dei gruppi colpiti. In alcuni dei casi osservati sono stati isolati ceppi di reovirus aviari. Il presente lavoro descrive il più grave tra gli episodi osservati e i relativi rilievi diagnostici

Materiali e metodi

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

Esami di laboratorio: gli esami virologici venivano allestiti impiegando uova embrionate di pollo SPF ("specific pathogen free") (SPAFAS® – USA). L'inoculo era costituito da un omogenato di organi prelevati in sede necroscopica (cuore, fegato, milza, cervello). Veniva utilizzata la via di inoculazione intra-allantoidea su embrioni di 9-11 giorni di incubazione. Le uova inoculate venivano sottoposte a speratura quotidiana. Venivano eseguiti diversi passaggi ciechi. A partire dal liquido allantoideo delle uova in cui si osservavano lesioni embrionali riferibili a reovirus veniva eseguito, come test di conferma, un esame mediante microscopia elettronica (ME). Quest'ultimo veniva inoltre eseguito direttamente a partire da

campioni di intestino prelevati in sede necroscopica. I campioni sono stati allestiti utilizzando la metodica Airfuge comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia (1).

Durante e alla fine del ciclo di allevamento venivano condotte indagini sierologiche per valutare i titoli anticorpali nei confronti delle principali forme patogeniche (anemia infettiva del pollo, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, bronchite infettiva aviaria, malattia di Newcastle, reovirus aviari).

Venivano infine condotti esami di laboratorio sul mangime impiegato nell'allevamento colpito e mirate alla ricerca di perossidi (metodo titrimetrico) e delle seguenti micotossine: aflatossine (B1, B2, G1, G2), ocratossina A, fumonisine totali, zearalenone, tossina T-2 (ELISA - Ridascreen®).

Identificazione del ceppo virale isolato: veniva impiegato un siero policlonale di coniglio (68A) e i seguenti anticorpi monoclonali anti-reovirus aviari: 154, 14-67 INT, INT 14-11, INT 13-6, 15-1 INT). La prova veniva condotta presso *Intervet International – Boxmeer – The Netherlands*.

Risultati

Venivano accasati 75000 pulcini broilers. Già al secondo giorno di vita si manifestava una forma enterica associata a cloacite. Gli indici di mortalità si mantenevano nella norma. Tuttavia un elevato numero di soggetti presentava crescita stentata e feci acquose. Da un gruppo di animali conferiti al laboratorio all'età di 10 giorni veniva rilevata una grave enterite accompagnata da un contenuto fluido-catarrale dell'intestino.

Dagli organi prelevati in sede necroscopica veniva isolato un virus successivamente identificato come reovirus mediante ME.

Il ceppo isolato reagiva positivamente nei confronti degli anticorpi monoclonali 14-67 INT e INT 14-11 venendo in questo modo classificato come ERS ("enteric reovirus strani").

All'età di 17 giorni alla forma enterica persistente si sovrapponeva una sintomatologia respiratoria. Il gruppo veniva tratto con ampicillina nell'acqua di

bevanda. L'esame anatomico-patologico evidenziava, accanto alle lesioni intestinali già descritte, pericardite e aerosacculite fibrinosa. Gli esami batteriologici portavano all'isolamento di un ceppo di *E.coli* a partire da fegato, milza e pericardio. Tramite ME veniva inoltre rilevata, a livello intestinale, la presenza di rotavirus. La sindrome osservata veniva ulteriormente confermata dall'esame di un altro gruppo di soggetti conferiti al laboratorio all'età di 31 giorni. Nel corso dell'intero ciclo di allevamento si assisteva alla formazione di soggetti di scarto la cui eliminazione portava ad una perdita complessiva del 17% del gruppo. Gli animali rimanenti presentavano comunque un grave ritardo di crescita: le femmine giungevano all'età di 46 giorni pesando solo 1,77 kg, mentre i maschi raggiungevano 2,25 kg a 54 giorni di età. Il peso medio finale, calcolato a 50 giorni, era di 2,02 kg. Le indagini sierologiche condotte a fine ciclo evidenziavano titoli anticorpali elevati nei confronti di reovirus e del virus della bronchite infettiva aviaria. L'esame del mangime rivelava la presenza di livelli anomali di tossina T-2 (38 ppb) e di fumonisine totali (3 ppm).

Discussione

Il ruolo dei reovirus aviari come agenti eziologici dell'artrite-tenosinovite virale è ormai noto da tempo. E' tuttora oggetto di discussione la loro importanza come agenti causali della SMA. L'isolamento di reovirus nel quadro di questa patologia contrasta infatti con il loro riscontro in gruppi sani (3). La recente osservazione, in vari paesi europei ed extra-europei, di gravi forme enteriche associate al costante isolamento di reovirus e la riproduzione sperimentale della malattia sembrano avvalorare la prima ipotesi (4). Inoltre in tutti i casi osservati (compreso quello descritto nel presente lavoro) i ceppi di reovirus sono stati isolati da vari organi (cuore, fegato, milza, cervello). Non si tratta quindi di ceppi a semplice localizzazione intestinale (considerata ubiquitaria). Dalle prove eseguite trova quindi conforto l'ipotesi secondo cui alcuni ceppi di reovirus possano avere un ruolo primario nel determinismo della SMA. L'attività patogena dei reovirus può essere esaltata da fattori manageriali e nutrizionali, come testimoniato dal riscontro di livelli anomali di micotossine nel caso in esame. Resta inoltre da chiarire l'esatta classificazione dei ceppi ERS. Essi mostrano, infatti, un profilo antigenico (rilevato mediante anticorpi monoclonali) diverso rispetto ai ceppi di reovirus responsabili della sindrome artrite-tenosinovite virale. I gruppi da riproduzione vengono vaccinati nei confronti dei reovirus mediante l'impiego di ceppi "articolari". Gli anticorpi materni potrebbero perciò essere insufficienti a proteggere la progenie nei confronti dei ceppi "enterici". Un altro aspetto da approfondire riguarda infine la possibilità di una trasmissione verticale dei ceppi ERS.

Bibliografia

1. Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D: (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet Rec*, 126: 581
2. McNulty M.S. (1993) "Reovirus" in: J.B.McFerran and M.S.McNulty.: *Virus infections of birds* first edition. Elsevier science publishers b.v., The Netherlands, 181-193.
3. Robertson M.D., Wilcox G.E., Kibenge F.S.B. (1984) "Prevalence of reoviruses in commercial chickens". *Australian veterinary journal*, 61, 319-322.

4. Van Loon A.A.W.M., Koopman H.C., Kosman W., Mumczur J., Szeleszczuk D., Karpinska E., Kosowska G., Luticken D. (2001) "Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens". *The veterinary quarterly*, 23, 129-133.

Figura 1: Microfotografia elettronica di reovirus aviari da liquido allantoideo

Figure 1: Microphotograph of reovirus particles observed in a sample of allantoic fluid.

