



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

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



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

***“Patologia neonatale
infettiva e nutrizionale del
tacchino”***

Relazioni e Comunicazioni

**Forlì,
2-3 ottobre 2003**

Relazioni

Incontro

“Le principali patologie presenti nell'allevamento avicolo durante il 2003”

- a) C. Terregino
(Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)
INFLUENZA AVIARE IN ITALIA: EPIDEMIA DA LPAI 2002-2003
- b) M. Delogu
(Università di Bologna)
STATO SANITARIO DELL'AVIFAUNA IN ITALIA: LA SITUAZIONE INFLUENZA AVIARE
- c) A. Moreno Martin
(Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna)
MALATTIA DI GUMBORO
- d) A. Ricci, D. Vio, M. Mancin, C. Saccardin
(Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)
ATTIVITÀ DEL CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE SALMONELLOSI:
LA RETE ENTER-VET
- e) P. Gaspari
(AUSL Cesena)
LE PRINCIPALI CAUSE DI RIFORMA RICONTRATE NEI MACELLI AVICOLI

convegno

“Patologia neonatale infettiva e nutrizionale del tacchino”

- 1) Y.M. Saif 10
(Ohio State University – Ohio – USA)
INFEZIONI VIRALI ENTERICHE DEI TACCHINOTTI
- 2) H.L. Shrivaprasad 13
(University of California - Davis – USA)
PANORAMICA DI MALATTIE BATTERICHE FUNGINE E PARASSITARIE IN GIOVANI TACCHINI
- 3) C. Nixey 18
(British United Turkeys Ltd – Willington – UK)
ALIMENTAZIONE E GESTIONE DEL TACCHINOTTO
- 4) G. Tosi, M. Crudi, L. Fiorentini, F. Paganelli, P. Massi 20
(Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna)
PREVALENZA DELLE MALATTIE BATTERICHE E VIRALI NEI TACCHINOTTI IN ITALIA
- 5) A. Lavazza, A. Moreno Martin, G. Tosi, L. Vinco G., Cerioli M. 21
(Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna)
DIAGNOSI ED EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE VIRALI ENTERICHE DEI TACCHINOTTI IN ITALIA

Comunicazioni

1)	R. Ceruti, L. Gavazzi, A. Volorio, A. Zanella VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA AVIARE: INFEZIONE SUBCLINICA NEL BROILER	37
2)	T. Rampin, G. Manarolla, G. Sironi, C. Guidarini, C. Motta OSSERVAZIONI SU CASI DI NEUROPATIA PERIFERICA IN POLLI DI LINEA LEGGERA	39
3)	G. Tacconi, P. Casagrande Proietti, R. Arcaro, R. Galli PROVA DI EFFICACIA DI UN ADDITIVO DI NUOVA CONCEZIONE PER LETTIERE NEL CONTROLLO DELL'AMMONIACA NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI DI POLLI DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI	41
4)	F. Pasquali, G. Manfreda INDIVIDUAZIONE DI MARKER GENETICI DELLA RESISTENZA A PENICILLINE ED AMINOGLICOSIDI IN CEPPI DI <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SUBSP. <i>ENTERICA</i> SIEROTIPO TYPHIMURIUM	43
5)	V. Bondioli, A. De Cesare, G. Manning, D. Newell, G. Manfreda PRELIMINARY STUDY ON CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) ACTIVITY IN <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> ISOLATED IN ITALY	45
6)	P. Casagrande Proietti, F. Passamonti, M.P. Franciosini, E. Del Rossi, G. Asdrubali INFEZIONE DA <i>HAFNIA ALVEI</i> IN GALLINE OVAIOLE	47
7)	A. Baiano, G. Matteoli, L. Dipineto, M. Kalbi, S. Troisi, M. Calabria, L.F. Menna, A. Fioretti SINDROME ISCHEMICA DEL GHEPPIO (<i>FALCO TINNUNCULUS</i>): SEGNALEZIONE DI 9 CASI RINVENUTI IN CAMPANIA (ITALIA)	49
8)	A. Baiano, L. Dipineto, G. Matteoli, A. Argenio, L.F. Menna, A. Fioretti REPERTI AUTOPTICI IN RAPACI ED UCCELLI SELVATICI ACCOLTI DAL CRAS - WWF DI CASERTA NEL BIENNIO 2001 - 2003	51
9)	C. Ferroni, G. Coccoli, G. Baronio, S. Piazza, F. Paterlini VALUTAZIONE DI TRATTAMENTI INNOVATIVI PER LA PASTORIZZAZIONE-STERILIZZAZIONE DELLE UOVA IN GUSCIO	53
10)	C. Tramuta, S. Buttignol, E. Bert, P. Nebbia IDENTIFICAZIONE DI <i>HELICOBACTER</i> IN SPECIE AVIARI CON METODICHE BIOMOLECOLARI	55
11)	M.P. Franciosini, E. Fringuelli, O. Tharuni, G. Guelfi, G. Asdrubali PCR NELLA DIAGNOSI IN VIVO DELL'INFEZIONE DA CIRCOVIRUS NEL PICCIONE	57
12)	C. Terregino, I. Capua, F. Mutinelli, A. Toffan VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA E DELL'INNOCUITA' DELLA VACCINAZIONE PER IL VAIOLO NEL CANARINO (<i>SERINUS CANARIUS</i>)	59
13)	C. Terregino, G. Cattoli, A. Toffan, M. Mancin, I. Capua RIDUZIONE DELLA SENSIBILITA' DI TACCHINI VACCINATI ALL'INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS INFLUENZALE H7N3 A BASSA PATOGENICITA'	61
14)	L. Fiorentini, F. Paganelli, R. Leonelli IDENTIFICAZIONE DI <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.: CONFRONTO CRITICO TRA TRE DIFFERENTI TECNICHE DIAGNOSTICHE	63
15)	F. Paganelli, L. Fiorentini, R. Leonelli POLYMERASE CHAIN REACTION E COLTURE CELLULARI: DUE TECNICHE DIAGNOSTICHE A CONFRONTO PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA AVIARE	65

16)	F. Paganelli, L. Fiorentini, R. Leonelli UTILIZZO DELLA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) PER DIFFERENZIARE CEPPI DI <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> VACCINALI DA CEPPI DI CAMPO	67
17)	P. Massi, R. Leonelli, D. Gelmetti, L. Fiorentini, G. Tosi SINDROME NEUROLOGICA PERIFERICA (PNS) IN GALLINE LEGGERE BIANCHE	69
18)	L. Bano, D. Comin, F. Agnolotti, P. Bonilauri, G. Merialdi PRIMO ISOLAMENTO DI <i>BRACHYSPIRA INTERMEDIA</i> DAL POLLO IN ITALIA	71
19)	P. Massi, G. Tosi, L. Fiorentini, R. Leonelli, G. Merialdi, M. Dottori, P. Bonilauri, M. Calzolari, D. Gelmetti, L. Bano PROVE PRELIMINARI D'INFEZIONE SPERIMENTALE SU POLLI S.P.F.(SPECIFIC PATHOGEN FREE) CON DUE CEPPI DI <i>BRACHYSPIRA PILOSICOLI</i> ED UNO DI <i>BRACHYSPIRA INTERMEDIA</i>	73
20)	A. Toffan, A. Zuin, D. Buson, B. Tramontan, I. Capua SVILUPPO, VALIDAZIONE E STANDARDIZZAZIONE DI UN TEST ELISA COMPETITIVO PER LA RICERCA DEGLI ANTICORPI CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE	75
21)	D. Giovanardi, E. Campagnari, R. L. Sperati, G. Ortali, V. Furlattini, P.E Pesente. DIAGNOSI BATTERIOLOGICA E BIOMOLECOLARE DELLA COLIBACILLOSI NEL POLLO	77
22)	E. Campagnari, R. L. Sperati, P. Pesente, G. Ortali, V. Furlattini, D.Giovanardi VARIABILITA' GENETICA ED EPIDEMIOLOGIA DEGLI APEC LUNGO LA FILIERA AVICOLA	79
23)	M. Battilani, M.V. Murgia, A. Lavazza, M. Cecchinato, E. Catelli CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ROTAVIRUS IDENTIFICATI IN CORSO DI FOCOLAI DI ENTERITE TRASMISSIBILE DELLA STARNA (<i>PERDIX PERDIX</i>): RISULTATI PRELIMINARI	81
24)	M. Rondena, T. Rampin, G. Manarolla, C. Longoni, G. Sironi, A. Montrasi, L.R. Sperati CASI DI CHERATOCONGIUNTIVITE DA <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> IN POLLASTRE COMMERCIALI	83
25)	G. Tosi, L. Ranieri, P. Pini, F. Ostanello IMPIEGO DI OLII ESSENZIALI ED ESTRATTI DI PIANTE NEL CONTROLLO DELL'ISTOMONIASI DEL TACCHINO: PROVE DI CAMPO ED INDAGINI DI LABORATORIO	85
26)	S. Bertuzzi, N. Tallarico, C. Canali EFFETTO DELL'AZIONE COMBINATA DI ACIDI ORGANICI ED OLII ESSENZIALI INCAPSULATI SULLE PERFORMANCE ZOOTECNICHE DI TACCHINI FEMMINE – PROVA DI CAMPO	87
27)	S. Bertuzzi, N. Tallarico, L. Fiorentini. EFFICACIA DI UNA MISCELA DI OLI ESSENZIALI INCAPSULATI NEI CONFRONTI DI UNA COCCIDIOSI MISTA NEL POLLO DA CARNE. STUDIO PRELIMINARE	89
28)	M. Cecchinato, E. Catelli, C.E. Savage, P. De Matteo, M. Faenzi, C.J. Naylor EVIDENZA DI PNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A IN CORSO DI UN FOCOLOAI DI TRT IN TACCHINI DA CARNE IN ITALIA	91
29)	G. Grilli, N. Giussani, R.Ceruti, L. Gavazzi, A.M. Pisoni, V. Ferrazzi, D. Gallazzi UTILIZZO DEL TOLTRAZURIL® NEL CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI DEL POLLO DA CARNE	93
30)	G. Grilli, L. Gavazzi, G. Manarolla, V. Ferrazzi, D. Gallazzi LESIONI PODALI E BENESSERE DEL BROILER: OSSERVAZIONI PRELIMINARI	95

RELAZIONE 0a

INFLUENZA AVIARIA IN ITALIA: EPIDEMIA DA LPAI 2002-2003

Calogero (Lillo) Terregino

Centro di Referenza Nazionale ed OIE per la malattia di Newcastle e l'Influenza aviaria, e Centro Regionale Epidemiologia Veterinaria del Veneto. IZS delle Venezie, Viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD)

Premessa

Negli ultimi cinque anni l'Italia è stata interessata da una serie di epidemie da virus influenzali che devono far riflettere seriamente su come sia delicata la situazione zoonosanitaria per il settore avicolo italiano, in particolare in aree ad alta concentrazione di allevamenti come il nord-Italia. E' noto infatti che dal 1997 vi sono state 2 epidemie di influenza aviaria ad alta virulenza (HPAI), causate dai sottotipi H5N2 ed H7N1 e 4 epidemie di influenza aviaria a bassa virulenza (LPAI) che hanno interessato soprattutto gli allevamenti avicoli di Veneto e Lombardia e marginalmente l'Emilia-Romagna. In particolare sono state colpite le aziende di tacchini da carne e di ovaiole. Le strategie di lotta adottate in passato per il controllo dell'HPAI hanno seguito le linee guida descritte nella Direttiva Europea 92/40/EEC che riconosce nei principali mezzi di lotta nei confronti dell'influenza aviaria la tempestiva segnalazione dei focolai, lo *stamping out* e l'adozione di misure restrittive nelle aree territoriali circostanti i focolai. In seguito alla recrudescenza dei focolai da virus a bassa patogenicità, l'Italia si è fatta promotrice di una strategia di lotta unica nel suo genere. L'immunizzazione di soggetti con vaccino eterologo "DIVA" (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) ha permesso da un lato il controllo dell'andamento dell'infezione nella popolazione vaccinata, e dall'altro ha permesso la libera commercializzazione in ambito comunitario carni di animali vaccinati per influenza aviaria.

Epidemia di LPAI (sottotipo H7N3)

Esordio e diffusione

La nuova epidemia influenzale ha esordito in maniera subdola in piena estate 2002. Il 29 luglio sono state segnalate positività sierologiche per AI (sottotipo H7) in tacchini da carne al macello in provincia di Reggio Emilia. Successivamente il 2 agosto sono state comunicate all'ASL della provincia di Brescia positività sierologiche per AI sottotipo H7, riscontrate in seguito a prelievi in autocontrollo in due allevamenti di tacchini da carne siti nel comune di Isorella (BS).

In questa prima fase non vi è stata sintomatologia clinica riconducibile ad infezione da virus influenzali. Le misure restrittive e l'indagine epidemiologica scattate in seguito ai sospetti focolai hanno previsto il blocco della movimentazione dei volatili presenti nel comune di Isorella, il censimento delle aziende avicole presenti nel raggio di 10 km dagli allevamenti sieropositivi ed il monitoraggio sierologico negli allevamenti avicoli presenti nel raggio di 10 km dagli allevamenti sieropositivi. In data 5 agosto il Centro di Referenza per la malattia di Newcastle e l'Influenza aviaria di Padova ha confermato la sieropositività per il sottotipo H7 negli allevamenti sospetti. Sono stati monitorati sierologicamente circa 200 allevamenti di specie sensibili dall'IZS di Brescia, 1 solo allevamento, nel comune Isorella a meno di 1 km da uno dei due allevamenti di tacchini sieropositivi, è risultato positivo. In quest'allevamento, di tipo rurale, erano presenti circa 200 animali tra cui polli, faraone, anatre, oche. Tutti i campioni testati per l'esame virologico sono sempre risultati negativi. La prova di inibizione della neuramminidasi eseguita presso il Centro di Referenza ha messo in luce una positività per anticorpi diretti verso la neuramminidasi di tipo 3 nei sieri di tacchini e dei polli rurali trovati positivi per H7 al test di inibizione dell'emoagglutinazione. Dopo circa due mesi vi è stata la vera esplosione dell'infezione. Il 10 ottobre 2002 i Servizi Veterinari della Regione Emilia-Romagna hanno comunicato positività sierologiche al macello per il sottotipo H7 del virus dell'influenza aviaria in tacchini da carne di un allevamento del comune di Ospitaletto di Brescia dove era stata segnalata precedentemente una lieve sindrome respiratoria. Tale positività era stata riscontrata in altri due allevamenti di tacchini da carne siti nelle immediate vicinanze. Il 17 ottobre sono stati segnalati dai Servizi Veterinari della Regione Lombardia 5 casi di sieropositività per virus influenzale, sottotipo H7, in altrettanti allevamenti di tacchini da carne situati nei comuni di Ospitaletto (3 allevamenti) e Roncadelle (2 allevamenti) in provincia di Brescia. Successivamente è stato isolato un virus influenzale, tipizzato come H7N3 dal centro di Referenza Nazionale, da soggetti clinicamente compromessi di un allevamento di tacchini da carne di circa 5 settimane del comune di Isorella (BS), in cui era stata segnalata sintomatologia respiratoria e aumento della mortalità.

Dopo una iniziale diffusione in Lombardia la malattia ha coinvolto anche il Veneto. Il 28 ottobre è stato identificato un focolaio di influenza aviaria a bassa patogenicità in un allevamento di tacchini da riproduzione sito nel comune di Mezzane (VR). Il 4 novembre 2002 sono stati confermati ulteriori due focolai di influenza aviaria, sottotipo H7 a bassa patogenicità, in altrettanti allevamenti di tacchini da carne nei comuni di Villafranca (VR) e Nogarole Rocca (VR). L'entrata dell'infezione in aree densamente popolate come queste, nonostante l'uso della vaccinazione dal mese di dicembre, ha portato alla rapida diffusione dell'infezione. In agosto è stata inoltre segnalata la presenza di virus LPAI in un allevamento (svezzatore) in provincia di Novara. Ad oggi (18.08.03) sono stati notificati 370 focolai distribuiti nelle regioni del Veneto, Lombardia, Emilia-Romagna e Piemonte. La distribuzione dei focolai e le specie e le categorie produttive interessate sono illustrate nelle tabelle 1 e 2 e nelle fig. 1 e 2.

Vie di trasmissione dell'infezione

La diffusione dell'infezione da un allevamento all'altro è da ricondurre principalmente a contatti indiretti tramite personale, veicoli ed attrezzature (veterinari, tecnici aziendali, squadre di carico e di vaccinazione, familiari). Molti sono stati gli allevamenti che hanno introdotto l'infezione durante le operazioni di carico per la macellazione. La presenza del virus in aree densamente popolate come quelle del nord-est ha favorito inoltre la diffusione

dell'infezione tramite contatti crociati tra aziende funzionalmente collegate mediante automezzi di servizio (trasporto di mangime, il raccogliatore di carcasse ecc.).

Sintomatologia osservata

La sintomatologia osservata nelle diverse specie e categorie di animali può essere così schematizzata:

Tacchini riproduttori

I sintomi in questi animali erano costituiti prevalentemente da una riduzione del consumo di alimento e depressione del sensorio a cui si associava per alcuni giorni calo dell'ovodeposizione (fino al 40 %) e alterazioni del guscio (decolorazione).

Tacchini da carne

Lieve sintomatologia riscontrata nei soggetti al di sotto dei 90 giorni e caratterizzata da abbattimento e sintomi respiratori. In alcuni casi si è registrato un significativo aumento della mortalità quando il virus influenzale agiva in associazione con altri patogeni presenti in allevamento (TRTV, *E. coli*, *P. multocida*)

Broiler riproduttori

Sintomatologia osservata solo nei soggetti in attività riproduttiva e costituita da lievi disturbi respiratori, abbattimento, cloacite, calo dell'ovodeposizione (massimo 15 %), incremento della mortalità (1% alla settimana)

Broiler

Nessuna sintomatologia collegata all'infezione

Ovaiole

Nessun sintomo rilevante. Segnalato sporadicamente un lieve calo dell'ovodeposizione.

Caratteristiche degli isolati

Tutti i virus isolati nel corso dell'epidemia sono stati tipizzati e sottoposti all'analisi delle caratteristiche di patogenicità presso il Centro di Referenza per la malattia di Newcastle e l'influenza aviaria di Padova. Tutti i ceppi sono stati identificati come virus influenzali di tipo A sottotipo H7N3 a bassa patogenicità (LPAI). L'indice di patogenicità intravenosa (IVPI) calcolato secondo le linee guida della Direttiva Europea 92/40/EEC sui primi isolati è risultato pari a 0,00, la sequenza amminoacidica dedotta del sito di clivaggio dell'emoagglutinina (...PEIPKGR*GLF....) di tutti i virus isolati è risultata tipica dei ceppi a bassa patogenicità.

L'analisi filogenetica di circa 1000 nucleotidi del gene HA ha messo in evidenza che il virus responsabile di questa epidemia non è assolutamente correlato al ceppo vaccinale A/ck/Pakistan/H7N3 utilizzato nell'epidemia 1999-2000 ma sembra essere correlato ad altri virus appartenenti al sottotipo H7 circolanti negli ultimi anni nel continente euro-asiatico.

Studi preliminari suggeriscono che il virus H7N3 responsabile dell'epidemia, è il risultato di una introduzione recente da uccelli selvatici (anatidi) i quali, come è noto, mantengono in natura tali virus e nei quali avvengono fenomeni di riassortimento genetico. Il progressivo adattamento all'ospite domestico del virus, che ha contribuito alla rapida e vasta diffusione dell'infezione, è testimoniato dalla comparsa di siti di glicosilazione addizionali (posizione 149) a livello della testa globulare dell'HA negli ultimi isolati.

Gestione dell'epidemia

Misure restrittive

Alla conferma del sospetto si è proceduto alla istituzione di una zona di protezione e di una zona di attenzione intorno all'allevamento infetto, alla chiusura dei focolai in seguito ad abbattimento e distruzione tramite *rendering* o macellazione in condizioni di sicurezza dei gruppi infetti, all'adozione di misure restrittive nelle aree territoriali circostanti i focolai e all'intensificazione del monitoraggio sierologico negli allevamenti limitrofi. L'accasamento negli allevamenti sede di focolai è stato preceduto dalle operazioni di pulizia e disinfezione conformemente a quanto previsto dall'allegato II del D.P.R. 656/96 e da un periodo di vuoto sanitario di almeno 7 giorni. L'accasamento comunque non veniva eseguito prima di 21 giorni dallo svuotamento dell'allevamento.

Vaccinazione

Il 10 dicembre 2002 è iniziata la campagna di vaccinazione sotto stretto controllo dei Servizi Veterinari nelle aree interessate dall'epidemia. La vaccinazione è stata concessa come un ulteriore strumento di lotta da affiancare alle misure di biosicurezza. Sulla base dei dati raccolti durante la campagna di vaccinazione 2000-2002, lo scopo della vaccinazione è stato quello di aumentare la resistenza degli animali all'infezione e contemporaneamente ridurre l'eliminazione del virus negli animali infetti in modo da avere una progressiva riduzione della contaminazione ambientale e del rischio di diffusione del virus. L'impossibilità di disporre in tempi brevi di una quantità sufficiente di vaccino destinato alla immunizzazione degli animali presenti nelle zone a rischio ha ritardato l'inizio della campagna di vaccinazione. Sempre a causa della indisponibilità del vaccino, in un primo momento si sono dovuti utilizzare due differenti tipi di vaccino: un vaccino omologo, costituito da un ceppo di influenza aviaria con lo stesso tipo di neuramminidasi del virus responsabile dell'epidemia, prodotto dalla ditta Merial® ed indicato con la sigla A/ck/Pakistan/95 H7N3 ed un vaccino eterologo, prodotto dalla ditta Intervet® costituito dal ceppo A/ck/ Italy/AG-473/1999 H7N1. Il vaccino omologo è stato utilizzato per immunizzare le ovaiole commerciali e gruppi di tacchini da carne le cui carni erano destinate al consumo nazionale. Attualmente l'uso del vaccino omologo è vietato ad eccezione del richiamo nei gruppi di ovaiole già vaccinati con l'omologo. Oltre al vaccino eterologo prima menzionato dal mese di agosto è disponibile per la campagna di vaccinazione un altro tipo di vaccino contenente il sottotipo H7N1, ceppo A/ck/ Italy/99 prodotto dalla ditta Merial®. Tuttavia bisogna ricordare che i volatili presenti in una stessa unità produttiva vaccinati con il vaccino eterologo prodotto da una ditta farmaceutica non potranno essere sottoposti a profilassi immunizzante con il vaccino di un'altra ditta produttrice.

L'uso di una strategia vaccinale "DIVA" (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) approvata dalla Comunità Europea (Decisione della Commissione 2002/945/CE del 13.12.02) ha permesso l'esportazione delle carni di animali vaccinati contro l'influenza aviaria.

L'area di vaccinazione comprende le province di Brescia, Mantova, Bergamo, Cremona, Verona, Vicenza, Padova (fig.3). Nonostante diversi episodi di rottura vaccinale, i cui motivi sono ancora in fase di studio, il più basso tasso d'incidenza settimanale negli allevamenti vaccinati (0,43%) rispetto a quello registrato negli allevamenti non vaccinati (6,8 %) potrebbe suggerire un effetto positivo dell'uso del vaccino nel piano di eradicazione.

Figura 1. Distribuzione dei focolai nelle regioni interessate dall'epidemia

Figure 1. Outbreaks in regions involved in the H7N3 LPAI epidemic

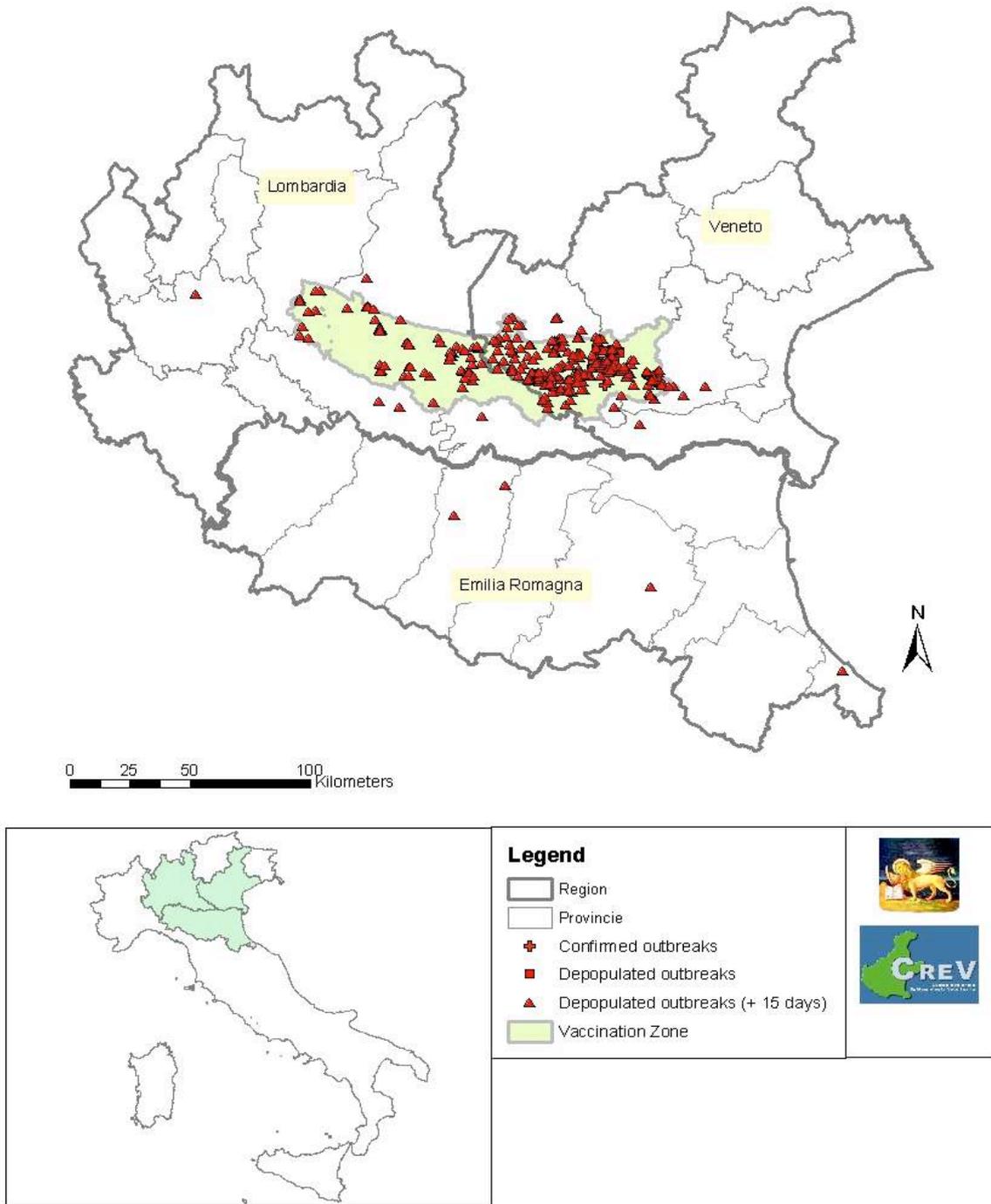


Tabella. 1 - Influenza aviaria a bassa patogenicità (H7N3): distribuzione del numero di allevamenti infetti (10/10/02 – 18/08/03)

Table 1- LPAI H7N3: distribution of the affected flocks (10/10/02 – 18/08/03)

Regioni	Specie \ Indirizzo produttivo										N° Totale focolai
	Tacchini da carne	Tacchini riprodut.	Ovaiole	Polli riprodut.	Broiler	Faraone	Svezinatori	Quaglie	Anatre	Rurali	
Veneto	263	4	6	5	3	4	0	1	1	0	287
Lombardia	55	1	6	6	1	2	5	1		1	78
Emilia Romagna	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	4
Piemonte	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
N° Totale focolai	314	5	13	12	4	6	7	2	1	1	370
N° Totale animali	5.247.056	42.164	1.507.830	276.101	77.000	163.981	32.602	66.000	4.000	12	7.416.746

Tabella 2. Influenza aviaria a bassa patogenicità (H7N3): distribuzione del numero di focolai estinti (10/10/02 – 18/08/03)

Table 2. LPAI H7N3: distribution of the closed outbreaks (10/10/02 – 18/08/03)

Regioni	Specie \ Indirizzo produttivo										N° Totale focolai estinti
	Tacchini da carne	Tacchini riprodut.	Ovaiole	Polli riprodut.	Broiler	Faraone	Svezinatori	Quaglie	Anatre	Rurali	
Veneto	254	4	6	5	3	4	0	1	1	0	278
Lombardia	55	1	6	6	1	2	5	1	0	1	78
Emilia Romagna	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	4
N° Totale focolai estinti	299	5	13	12	4	6	6	2	1	1	360
N° Totale animali abbattuti	1.951.461	23.206	1.507.830	276.101	77.000	163.981	24.562	66.000	4.000	12	4.094.153
N° Totale animali macellati	3.189.495	18.958	0	0	0	0	0	0	0	0	3.208.453
N° Totale animali	5.140.156	42.164	1.507.830	276.101	77.000	163.981	24.562	66.000	4.000	12	7.302.600

Figura 2. Distribuzione settimanale dei focolai in Veneto e Lombardia (10/10/2003 – 31/07/2003)
 Figure 2. Weekly distribution of the outbreaks in Veneto and Emilia-Romagna regions (10/10/2003 – 31/07/2003)

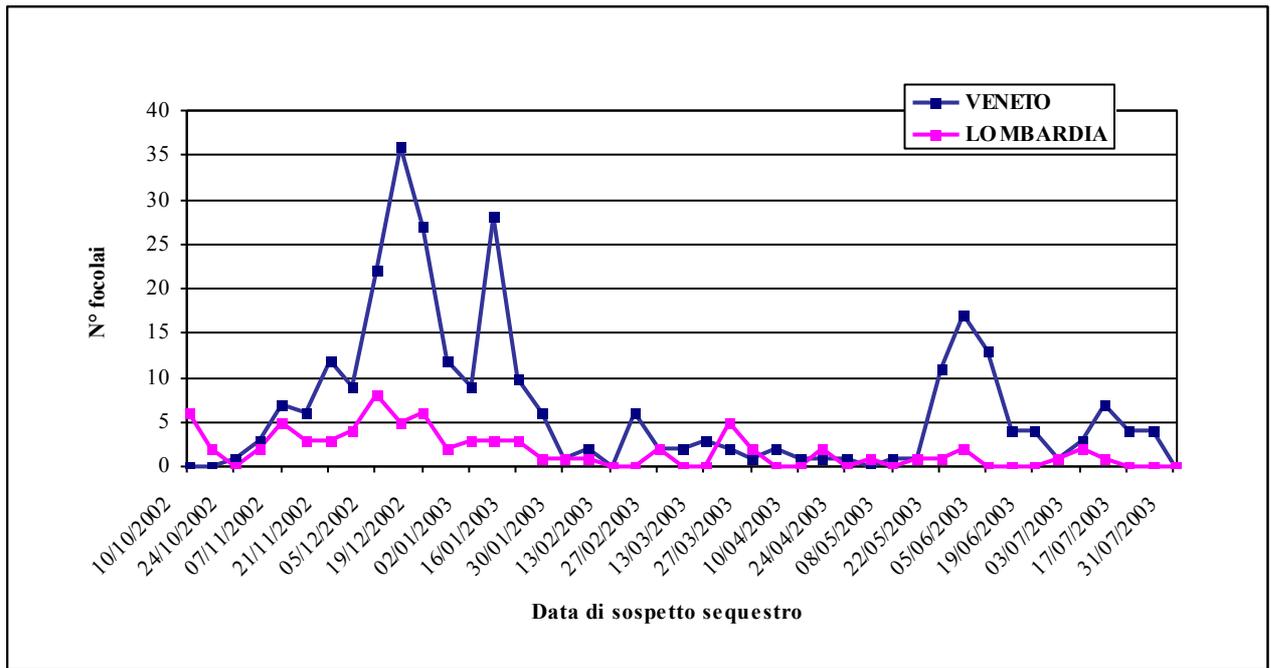
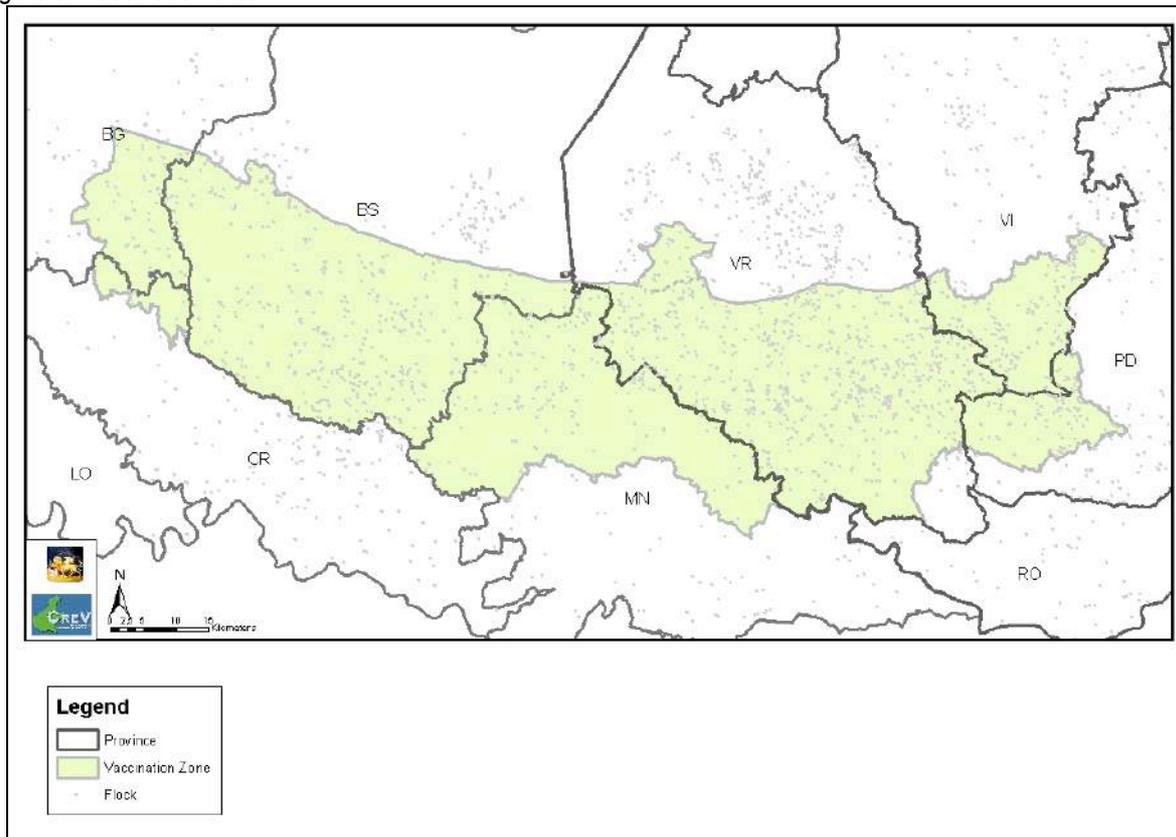


Figura 3. Area di vaccinazione
 Figure 3. Vaccination area



RELAZIONE 0b

STATO SANITARIO DELL'AVIFAUNA IN ITALIA: LA SITUAZIONE INFLUENZA AVIARE

Mauro Delogu

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna
tel +39 051792078 e-mail delogu@vet.unibo.it

I virus influenzali di tipo A

La filogenesi dei virus influenzali ha premiato evolutivamente la possibilità di possedere un genoma segmentato. Tale condizione, negli *Orthomyxovirus* di tipo A è caratterizzata dalla presenza di 8 segmenti liberi di RNA lineare a singola elica e a polarità negativa. Questo elemento condiziona grandemente le potenzialità adattative che tale virus manifesta quale risposta alla pressione selettiva, sia attraverso meccanismi di mutazione spontanea sia attraverso la possibilità di riassortimento genetico in concomitanza di situazioni di coinfezione. In questo senso gli aspetti microevolutivi del virus (evoluzione pluridirezionale) (6) offrono allo stesso notevole capacità adattative esplicabili istantaneamente nel microtempo con il susseguirsi delle generazioni virali. Tale potenzialità di mutazione inserita nel tempo evolutivo dell'ospite (macrotempo) si traduce in un vantaggio evolutivo del virus sullo stesso. Solamente nel macrotempo quindi si raggiunge quell'equilibrio che prende il nome di coevoluzione adattativa, elemento portante nel determinare il ruolo epidemiologico delle diverse specie (13). Tra gli elementi condizionanti la capacità di infettare e di ammalare singole specie delle quasi 400 costituenti l'avifauna italiana, alcuni sono di pertinenza del virus (presenza di amminoacidi basici nel sito di clivaggio dell'emoagglutinina) altri della specie ospite (proteasi che favoriscono il clivaggio dell'HA; PH acido che consente attraverso modificazioni steriche l'apertura dell'endosoma cui segue la replicazione virale). La distribuzione tissutale delle proteasi e le diverse condizioni di PH nei parenchimi definiscono sia il tropismo del virus sia la capacità dello stesso di infettare o meno con diversa gravità, le diverse specie aviarie selvatiche e domestiche. Ciò sta alla base del determinismo dello spettro d'ospite e quindi del ruolo epidemiologico delle diverse specie selvatiche nella diffusione o nel mantenimento dell'agente eziologico (22).

Stalknecht e Shane riportano, in un accurato resoconto, elaborato nel 1988 tratto dai dati riferiti agli isolamenti virali su specie selvatiche a vita libera. Tale lavoro coinvolgeva 88 specie, suddivise in 22 famiglie e 12 ordini: Gaviformi, Podicipediformi, Procellariiformi, Pelecaniformi, Ciconiformi, Anseriformi, Galliformi, Columbiformi, Gruiformi, Caradriformi, Piciformi, Passeriformi. La percentuale complessiva di isolamento è risultata pari al 10,9% (2317 virus influenzali isolati da 21.318 uccelli) anche se va segnalato che ben 2173 virus provenivano da 14.303 Anseriformi selvatici. In questi ultimi la percentuale risultava essere pari al 15,2% seguita da Passeriformi con 2,9% e dai Caradriformi con il 2,2% (19). I dati sovraesposti, ulteriormente supportati dalla letteratura rendono evidente come gli Anseriformi possiedano un ruolo di primo piano nell'ecologia della malattia (21).

Il serbatoio selvatico

Se dalle specie aviarie originano tutti i sottotipi H (H1/H15) ed N (N1/N9), è probabilmente negli Anseriformi che il virus ha trovato il serbatoio epidemiologico. Tale gruppo origina filogeneticamente tra i 40/ 25 milioni di anni (Oligocene), anche se la speciazione nelle forme attuali è riferibile al Miocene in un'epoca compresa tra i 10 ed i 7 milioni di anni fa (2). In questo Ordine zoologico il virus ha avuto modo di coevolvere raggiungendo una condizione vicina alla stasi evolutiva, stato che nell'ospite anseriforme si esprime attraverso di una quasi totale attenuazione della patogenicità ed una ridotta frequenza di *drift* (virus stabili). In tempi successivi i virus influenzali hanno esteso lo spettro d'ospite ad altri gruppi aviari esprimendo a volte patogenicità elevate (A/ Tern / South Africa /1961 (H5N3)). Ulteriori frontiere si sono aperte per il virus con la possibilità, spesso mediata dal suino, di utilizzare come ospite anche i mammiferi quali il cavallo (H7N7, H3N8), il furetto (H10N4), le foche (H7N7, H4N5) o l'uomo H1N1, H2N2, H3N2) (14, 21). In epoca recente, si è potuto constatare come virus aviari siano in grado di infettare e a volte ammalare l'uomo direttamente (H5N1, H9N2, H7N7) (12).

Tra le specie aviarie a vita libera, gli Anseriformi rappresentano il serbatoio dell'agente eziologico, ovvero il gruppo in cui questo si perpetua nel tempo. Le caratteristiche etologiche quali l'elevata tendenza all'aggregazione, la possibilità di eseguire migrazioni nonché una intima interazione con l'ambiente acquatico ne fanno un ospite ideale. La replicazione virale avviene in queste specie principalmente nel tratto intestinale e l'eliminazione è limitata ad un periodo compreso mediamente tra le 2 e le 4 settimane. In Europa, l'Ordine è rappresentato da circa 13/15.000.000 di individui, distribuiti per classi d'età in un rapporto 1:1 tra giovani ed adulti. La *sex ratio* nelle diverse specie è quasi sempre leggermente a favore dei maschi. In Europa (Palearctica) le specie che con diversa importanza svolgono il ruolo di serbatoio per i virus influenzali appartengono principalmente alla famiglia *Anatinae*. La distribuzione è Oloartica per Volpoca (*Tadorna tadorna*), Fischione (*Anas penelope*), Canapiglia (*Anas strepera*), Alzavola (*Anas crecca*), Codone (*Anas acuta*), Edredone (*Somateria mollissima*), Re degli edredoni (*Somateria spectabilis*), Moretta arlecchino (*Histrionicus histrionicus*), Moretta codona (*Clangula hyemalis*), Orchetto marino (*Melanitta nigra*), Orco marino (*Melanitta fusca*), Germano reale (*Anas platyrhynchos*) e Smergo minore (*Mergus serrator*). Nella regione Oloartica e Orientale si trovano Alzavola, Germano reale, Codone, Moretta grigia (*Aythya marila*), Smergo maggiore (*Mergus merganser*). Le specie presenti unicamente nella Regione Palearctica sono il Gobbo rugginoso (*Oxyura leucocephala*) e l'Anatra marmorizzata (*Marmaronetta angustirostris*) mentre nella Neartica si trovano il Fischione americano (*Anas americana*) e la Marzaiola americana (*Anas discors*). Troviamo ancora Casarca (*Tadorna ferruginea*), Anatra mandarina (*Aix galericulata*), Alzavola asiatica (*Anas formosa*) e Fistione turco (*Netta rufina*) che frequentano le regioni Palearctica e Orientale mentre solo il Germano reale può essere rinvenuto in quella Oloartica, come anche in quella Orientale e Australiana. Marzaiola (*Anas querquedula*), Moriglione (*Aythya ferina*), Moretta (*Aythya fuligula*), e Moretta tabaccata (*Aythya nyroca*), frequentano le regioni Palearctica, Etiopica ed Orientale a

differenza del Mestolone (*Anas clypeata*) che si rinviene nella regione Etiopica, Orientale ed Oloartica (2). Risulta evidente dalle informazioni fornite, come le singole specie possono essere distribuite su aree zoogeografiche diverse, e come per molte la presenza nel Paleartico rappresenti una costante.

I motivi di questa distribuzione sono spesso condizionati sia dalla presenza di habitat sia dalla diversa localizzazione dei quartieri di riproduzione (Nord/Est) e di svernamento (Sud/Ovest). Le anatre selvatiche migrano per diverse necessità biologiche che ne condizionano la sopravvivenza e che sono variabili da specie a specie e da popolazione a popolazione all'interno di ciascuna specie. Il raggiungimento dei territori alternativamente impiegati avviene attraverso movimenti di migrazione stagionale con movimenti di discesa, alla ricerca di aree a clima mite in tarda estate ed autunno (verso le aree meridionali dell'emisfero boreale) e di risalita verso le aree di riproduzione in tardo inverno ed inizio primavera (aree settentrionali, post-disgelo). Nel primo caso la popolazione riproduttiva migra verso sud accompagnata dai soggetti giovani nati nell'anno, mentre nella migrazione di risalita tutto il contingente è costituito da individui potenzialmente riproduttivi. Tale dato risulta di particolare rilievo alla luce del fatto che è la popolazione giovanile a consentire la ciclicità di dell'infezione influenzale. La fase di discesa è caratterizzata da un flusso più lento rispetto alla più veloce risalita con soste protratte nei siti idonei (3). Le popolazioni di anatidi del Paleartico, sono in ultimo "parzialmente migratrici" con una componente sedentaria ed una migratrice in quasi tutte le specie, con eccezione della Marzaiola e della Pesciaiola (*Mergus albellus*) quasi totalmente migratrici e della Casarca, del Gobbo rugginoso e dell'Anatra marmorizzata, sedentarie (2). Le vie di migrazione impiegate dagli anseriformi durante l'autunno nell'attraversamento del Paleartico Occidentale sono molteplici. Tra queste troviamo quella passante su Svezia-Francia-Gibilterra-Africa, quella su Finlandia-Olanda-Italia nord occidentale-Sardegna-Africa, quella che dal centro Europa attraversa i Balcani, il sud Italia e passando per la Sicilia raggiunge il Nord Africa. Tra le rotte più orientali troviamo quelle che dall'Europa centrale passano sui Balcani, sulla Grecia raggiungendo il Nord Africa, mentre una ulteriore attraversa il Centro Europa per sfiorare il Mar Nero, sorvolare la Turchia ed entrare in Africa orientale. Eccezione fatta per le marzaiole che svernano principalmente in Africa Occidentale compiendo una migrazione transahariana, tutte le altre specie utilizzano le zone umide del bacino del Mediterraneo come aree di svernamento (16). L'Italia funge sia da area di svernamento e di riproduzione per alcune specie (Germano reale) sia di solo svernamento per la maggior parte degli anatidi con coinvolgimento migratorio primaverile e autunnale. Le popolazioni svernanti in Italia sono di provenienza europea nord-orientale.

I censimenti che vengono effettuati annualmente nei quartieri invernali danno la consistenza totale della popolazione di anatidi del Paleartico oscillante tra i 13 e i 15 milioni di individui. Tra le specie maggiormente rappresentate in termini numerici, il Germano reale possiede la popolazione stimata in 5 milioni di individui dei quali 76.000/100.000 svernanti in Italia, seguita dall'Alzavola con 2,5 milioni di cui 1 nel bacino del Mediterraneo e 51.000 soggetti in Italia. Tra le altre specie, il Fischione sverna nel Paleartico con circa 1,5 milioni di soggetti di cui 1 milione nell'area mediterranea e 71.000 in Italia, il Codone con 1,3 milioni di capi e circa 200.000 nella regione Mediterranea, il Mestolone con 1 milione di animali di cui il 10% svernanti nel Mediterraneo e 20.000 in Italia. Il Moriglione sverna in Area Mediterranea con circa 750.000 soggetti di cui 43.000 in Italia, mentre sono circa 8.500 gli individui svernanti in Italia per la Moretta (1, 2, 15, 17).

Le aree di svernamento presenti sul territorio italiano sono numerose e variano a seconda delle caratteristiche ecologiche delle specie. E' comune per le anatre tuffatrici svernare nei maggiori specchi d'acqua nazionali caratterizzati da acque profonde, mentre le anatre di superficie si concentrano prevalentemente in paludi dove siano presenti acque basse. I siti di svernamento sono spesso aree ad elevata produttività, in cui si concentrano numerosissimi individui appartenenti a diverse specie di anatidi che per un periodo temporale condividono questi ambienti con una quantità eterogenea di altre specie ornitiche a loro volta sia stanziali sia migratrici. Si vengono così a costituire aggregazioni omo ed eterospecifiche catalizzate dalla presenza di fattori ambientali favorevoli quali principalmente la disponibilità trofica e l'assenza di disturbo venatorio. In questi contesti si creano delle situazioni particolarmente favorevoli per la possibile trasmissione di virus influenzali sia tra popolazioni allopatriche omospecifiche, sia in gruppi eterospecifici. L'aggregazione autunno-invernale avviene in presenza dei soggetti giovani delle diverse specie, individui caratterizzati da una spiccata sensibilità all'agente eziologico (3).

La qualità dell'acqua, intesa come pH, salinità e temperatura può divenire un ulteriore elemento che facilita la persistenza del virus nell'ambiente (18) e la sua assunzione attraverso la filtrazione, come elemento di ricerca alimentare o di abbeverata, espone all'assunzione dell'agente virale. In chiave ecologica la profondità e il ricambio dell'acqua costituiscono due dei principali elementi di interazione tra ospite e agente eziologico. In aree limitate la notevole densità dei soggetti in rapporto all'esiguità delle superfici d'acqua aumenta notevolmente la frequenza di contatto tra gli individui, con ulteriore agevolazione della diffusione del virus. Condizioni climatiche particolarmente sfavorevoli nel periodo invernale (ghiaccio) possono contribuire all'accentuazione delle interazioni. L'acqua va inoltre vista non solo come elemento di trasmissione dell'agente virale, ma anche di conservazione temporale dello stesso (20), consentendo la trasmissione dell'infezione in assenza di contatto diretto tra gli individui. Viene inoltre a determinarsi un'ulteriore potenzialità di trasmissione, mediante l'abbattimento di barriere etologiche tra specie diverse tramite l'assunzione di acqua d'abbeverata (3). Da quanto esposto si può osservare come il limite ecologico di interazione tra specie venga così facilmente superato e come sia facilitata la circolazione del virus sia nelle specie serbatoio sia negli epifenomeni. In realtà la modesta ospite-specificità dell'influenza trova in quanto detto tutta una serie di opportunità epidemiologiche. L'agente eziologico può trasmettersi attraverso l'acqua a una nutrita gamma di specie aviarie in cui è in grado o meno di dare malattia.

La circolazione del virus nelle specie serbatoio è condizionata dal fatto che si tratti o meno di sottotipi normalmente presenti nella popolazione. Nel caso in cui vi sia una parziale immunità del serbatoio, i virus percorrono due vie di perpetuazione; la prima si verifica in Italia tra agosto ed ottobre, periodo in cui la

popolazione giovanile delle anatre (circa 50.000 germani reali giovani all'anno) incontra l'agente eziologico nell'ambiente infettandosi e fungendo da volano di amplificazione, inducendo un aumento stagionale della pressione infettante del virus nell'ambiente (Figura 1). Nel periodo invernale la presenza dei sottotipi endemici diviene meno evidente, spesso svelabile con difficoltà in una microcircolazione a bassissima pressione infettante in virtù della scarsissima eliminazione virale (11) (Figura 2). Ben diversa è la situazione che si viene a creare qualora un sottotipo immunitariamente sconosciuto alla popolazione selvatica entri nella stessa. In questo caso l'infezione assume caratteristiche epidemiche ed il virus utilizza tutta la popolazione per replicarsi, senza distinzioni di classi di età. Il potenziale aumento alla replicazione incontra come unico limite reale la quantità numerica di ospiti recettivi e la loro possibilità di interazione, minime nel periodo riproduttivo e massime nel periodo di svernamento. In questo caso tutta la popolazione funge da substrato e quindi da volano di amplificazione della pressione virale nell'ambiente (Figura 3).

Gli epifenomeni

In generale, molte delle oltre 400 specie ornitiche italiane, possono assumere il ruolo di epifenomeno (19), ovvero specie potenzialmente capaci di albergare e diffondere il virus per un periodo di tempo in genere limitato ma non in grado di consentirne il mantenimento in natura. Il ruolo ecologico di tali specie nel ciclo epidemiologico dell'influenza aviaria è spesso oggetto di confusione. L'infezione assume caratteristiche epidemiche, elemento che in tempi variabili a seconda della densità, della frequenza di interazione individuali e di gruppo si conclude con l'autoestinzione della malattia. In Italia, nel corso di un monitoraggio permanente attivo sull'avifauna selvatica dal 1992 ad oggi, si è potuto osservare come la circolazione dei virus influenzali negli epifenomeni sia di gran lunga ridotta se paragonata a quella dei serbatoi (9, 10, 11). L'indagine ha dimostrato come specie caratterizzate da migrazioni nell'Est Europa o in Sud Africa (Caradriformi – *Laridae*, *Sternidae*), specie di possibile interfaccia ecologica (Passeriformi di palude), specie di Galliformi stanziali (Fagiano) o migratori (Quaglia) caratterizzati da affinità filogenetica con il Pollo, Anatidi a svernamento sub sahariano (Marzaiola) e specie consumatrici terziarie (rapaci diurni e notturni) evidenzino un'interazione con virus influenzali assente/modesta e svelabile solo sierologicamente (8,10). Tra le ulteriori conseguenze che l'infezione degli epifenomeni comporta nell'epidemiologia dell'influenza aviaria, troviamo la minor stabilità del virus, con una più facile evoluzione pluri-direzionale verso sottotipi ad alta patogenicità. Un ulteriore fattore di rischio è costituito dall'interazione epifenomeno selvatico e specie domestiche allevate. In questo caso, le specie selvatiche sinantropiche possono fungere da ponte di interconnessione (interfaccia ecologica) tra le due realtà, mettendo in contatto biocenosi altrimenti lontane e facilitando la circolazione del virus tra le stesse (3, 7). Sovente queste interazioni necessitano di ulteriori fattori coadiuvanti quali possono essere l'utilizzo di acqua contaminata dalle specie serbatoio (Figura 4).

Conclusioni

In base a quanto sopra esposto è possibile formulare alcune ipotesi sulle recenti epidemie italiane da H7N3 e da H7N1.

Il primo sottotipo infatti era presente nelle popolazioni selvatiche serbatoio già nell'ottobre 2001, con quasi un anno di anticipo sulla comparsa dei primi focolai nell'allevamento intensivo. Questo rappresenta il primo caso in cui si giunge all'isolamento di un virus influenzale prima nel serbatoio naturale e poi nell'ospite domestico. L'ingresso del virus negli allevamenti intensivi è stato dimostrato dalla mutazione adattativa che ha manifestato il precursore diretto (selvatico) legata al cambio d'ospite (domestico) (4).

Il sottotipo H7 era assente virologicamente e sierologicamente in Italia nelle popolazioni selvatiche di uccelli acquatici dal 1992 sino al settembre 2000, quando comparvero le prime positività sierologiche per H7N1 nelle specie selvatiche serbatoio. Questo avvenne ad un anno di distanza dall'epidemia da H7N1 che devastò l'allevamento intensivo italiano (De Marco *et al*, dati non pubblicati).

Analizzando i fattori di rischio, se osserviamo il panorama europeo e quello nazionale dal punto di vista dell'agente eziologico, vedremo come esistono specie potenziali serbatoi ed epifenomeni sia domestiche sia selvatiche e quali siano le entità dei rapporti tra le stesse. In Europa la popolazione recettiva di individui giovani di specie serbatoio a vita libera non supera i 7,5 milioni con 50/60.000 individui in Italia. Nella sola Italia vengono allevate annualmente circa 7 milioni di anatre di cui il 90 % tra Lombardia e Veneto (dati UNA 2001) e tra queste circa 600.000 all'anno vengono reimmesse in natura per attività venatorie. Questo dato deve far riflettere, in quanto la popolazione domestica serbatoio potenzialmente recettiva è di circa 120 superiore a quella selvatica. Un ulteriore elemento di considerazione è dato dai 600.000 individui immessi all'anno in natura; rappresentano 10/12 volte la popolazione selvatica giovanile recettiva e una volta rilasciati forniscono al virus, infettandosi, un volano di amplificazione potenziale in grado di aumentare enormemente la pressione virale in natura ed attraverso questa l'interazione virus/interfaccia ecologica/specie domestiche. Un ultimo spunto di riflessione lo si può avere osservando i circa 4 miliardi di polli allevati all'anno in Europa, dei quali 560 milioni in Italia. Per un virus quale quello influenzale, essi costituiscono un substrato ideale, favorito dalla densità (elevata frequenza di contatti tra infetti e recettivi) e dalla omogeneità genetica che risparmia all'agente eziologico, una volta entrato, difficoltà di adattamento all'ospite. Ulteriore elemento a vantaggio dell'agente eziologico è che questo interagisce per tutto l'anno con un substrato continuamente rinnovato dalla rapidità dei cicli di produzione (5). Il virus incontra sempre un numero elevatissimo di individui recettivi, nel quale tende a percorrere tutte le strade evolutive, inclusa quella verso l'alta patogenicità. L'individuazione delle strategie ecologiche di questa malattia si dimostra una pietra miliare nella comprensione della stessa e nella corretta gestione di quanto da essa determinato.

Ringraziamenti

Ringrazio vivamente tutto il gruppo di lavoro: Maria Alessandra De Marco (Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica- Ozzano Emilia, Bologna); Isabella Donatelli, Laura Campitelli, Maria Tollis, Livia Di Trani (Istituto Superiore di Sanità, Roma); Giuseppe Barigazzi, Emanuela Foni, Chiapponi C., Paolo Cordioli, Fausto Marzadori, Elisabetta Raffini, Giampaolo Tozzoli, (Istituto

Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia); Antonio Canu, Marco Carsughi, Luigi Calchetti, Fabio Cianchi (WWF Italia); Robert G. Webster, (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA)

Bibliografia

- Baccetti, N., Dall'Antonia, P., Magagnoli, P., Melega, L., Serra, L., Soldatini, C. and Zenatello, M., 2002. Risultati dei censimenti degli uccelli acquatici svernanti in Italia: distribuzione, stima e trend delle popolazioni nel 1991-2000. *Biologia e Conservazione della Fauna*, 111, 1-240.
- Chelini, A., 1984. *Le Anatre Selvatiche*, (Editoriale Olimpia, Firenze), 1-383.
- Delogu M., De Marco M.A., Donatelli I., Campitelli L., Catelli E. (2003) Ecological aspects of influenza A virus circulation in wild birds of the Western palearctic. *Veterinary Research Communications* 27, Supplement 1, pp.101-106.
- Campitelli L., Mogavero E., De Marco M.A., Delogu M., Puzelli S., Frezza F., Facchini M., Chiapponi C., Foni E., Cordioli P., Webby R., Barigazzi G., Webster R.G., Donatelli I.- Identification in the wild bird reservoir of virus precursors of H7N3 influenza strains responsible for low pathogenic avian influenza in domestic poultry in Italy during 2002-03. Options for the Control of Influenza V. Bankoku-Shinryokan, Okinawa, Japan, October 7/11 October 2003 pp.125 (abstract).
- Campitelli L., Fabiani C., Puzelli S., Fioretti A., Foni E., De Marco M.A., Krauss S., Webster G.R., Donatelli I. 2001. H3N2 Influenza Viruses from domestic chickens in Italy: an increasing role of chickens in the ecology of influenza? *J. Gen. Virol.* 2002 83: 413-420
- Dale H.C., Moore J., 1997. *Host Parasite evolution: general principles and avian model*, Oxford University Press, Oxford.
- De Marco, M.A., 1998. Influenza: tutta colpa dei selvatici? *Rivista di Avicoltura*, LXVII (9), 47-53.
- De Marco, M.A., Guberti, V., Raffini, E., Foni, E., Delogu, M. and Donatelli, I., 1999. Influenza aviaria: indagini epidemiologiche in specie selvatiche. *La Selezione Veterinaria*, (12), 897-907.
- De Marco, M.A., Guberti, V., Foni, E., Raffini, E., Campitelli, L., Barigazzi, G., Delogu, M. and Donatelli, I., 2000. Waterfowl wintering in Italy: a Serological and Virological Survey for type A Influenza Viruses. In E. Brocchi and A. Lavazza (eds. in chief), *Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology*, Brescia, 2000 (Published by: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia and Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia), 303-304.
- De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Delogu M., Donatelli I. (2003) Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Veterinary Research Communications* 27, Supplement 1, pp.107-114.
- De Marco M. A., E. Foni, L. Campitelli, E. Raffini, L. Di Trani, M. Delogu, V. Guberti, G. Barigazzi, and I., Donatelli. (2003) Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-1999 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases* 47 : 861/ 866.
- Donatelli I., Puzelli S., Affinito C., Delogu M., De Marco M.A., (2003) Influenza viruses: structure and interspecies transmission mechanism. *Veterinary Research Communications* 27, Supplement 1, pp. 115-122.
- Guan, Y., Peiris, M., Kong, K.F., Dyrting, K.C., Ellis, T.M., Sit, T., Zhang, L.J. and Shortridge, K.F., 2002. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology*, 292, 16-23.
- Horimoto, T. and Kawaoka, Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (1), 129-149.
- Rose, P.M. and Scott, D.A., 1997. *Waterfowl Population Estimates*. Wetlands International Publication No. 44, (Wetlands International, Wageningen, The Netherlands), 1-106.
- Scott, D.A. and Rose, P.M., 1996. *Atlas of Anatidae populations in Africa and Western Eurasia*. Wetlands International Publication No. 41, (Wetlands International, Wageningen, The Netherlands), 1-336.
- Serra, L., Magnani, A., Dall'Antonia, P. and Baccetti, N., 1997. Risultati dei censimenti degli uccelli acquatici svernanti in Italia, 1991-1995. *Biologia e Conservazione della Fauna*, 101,1-312.
- Stalknecht, D.E., Kearney, M.T., Shane, S.M. and Zwank, P.J., 1990a. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, 34, 412-418.
- Stalknecht, D.E. and Shane, S.M., 1988. Host Range of Avian Influenza Virus in free-living birds. *Veterinary Research Communications*, 12, 125-141.
- Stalknecht, D.E., Shane, S.M, Kearney, M.T. and Zwank, P.J., 1990b. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, 34, 406-411.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. and Kawaoka, Y., 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews*, 56 (1), 152-179.
- Wobeser, G.A., 1994. *Investigation and management of disease in wild animals*, Plenum Press, New York), 1-265.

Figura 1. Comportamento dei sottotipi "endemici"(es. H1) nel periodo estivo/autunnale in presenza di immunità di popolazione

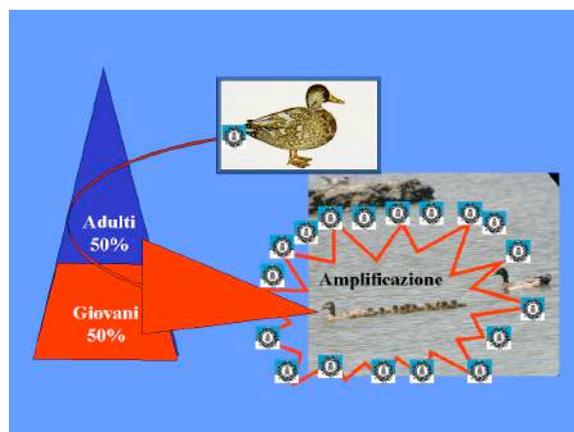


Figura 2. Comportamento dei sottotipi "endemici" (es. H1) nel periodo invernale in presenza di immunità di popolazione

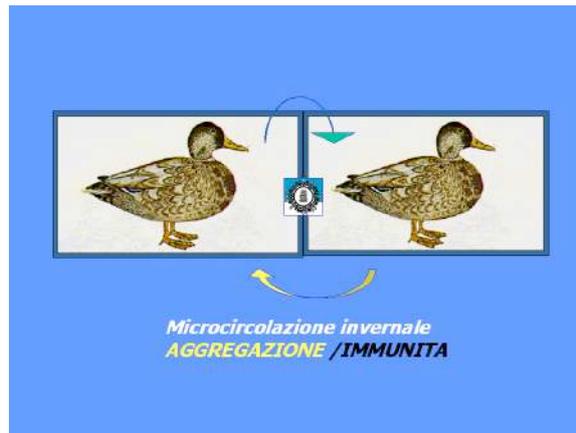


Figura 3. Comportamento di nuovi sottotipi "epidemic" (es. H7) in assenza di immunità di popolazione

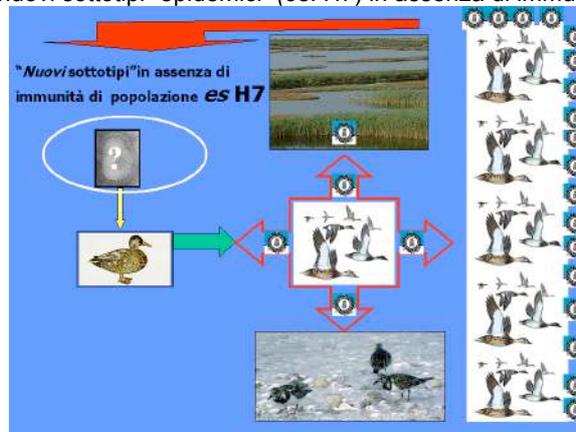
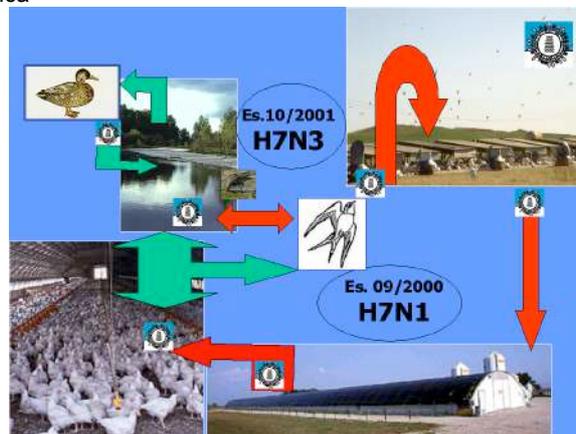


Figura 4. L'interfaccia ecologica



RELAZIONE 0c

RELAZIONE 0d

ATTIVITÀ DEL CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA PER LE SALMONELLOSI: LA RETE ENTER-VET

Antonia Ricci¹, Denis Vio¹, Marzia Mancin², Cristina Saccardin¹

¹Centro Nazionale di Riferenza per le Salmonellosi – Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

²Centro Regionale di Epidemiologia Veterinaria - Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Summary: Since the beginning of 2002 in Italy a network for Salmonella surveillance in animals and food was set up. The network is called Enter-Vet, and it acts in strict collaboration with the Enter-Net system, coordinated in our country by Istituto Superiore di Sanità. The Italian Istituti Zooprofilattici Sperimentali transmit data to the National Reference Laboratory for Salmonella, which manages the central database and performs subtyping of strains (phage-typing, molecular typing). In this paper the report of 2002 is presented.

Il sistema di sorveglianza delle salmonellosi a livello europeo è attivo da molti anni, ed è costituito dalla rete Enter-net (www.enter-net.org.uk), che riguarda in modo specifico le infezioni umane da *Salmonella* spp. e da *E.coli* VTEC. La rete Enter-net coinvolge i 15 Paesi dell'Unione Europea nonché il Canada, il Giappone, il Sud Africa, la Svizzera e la Norvegia, ed opera attraverso la raccolta delle notifiche relative agli isolamenti di *Salmonella* e *E. coli* VTEC da campioni di origine umana, l'identificazione e lo studio degli episodi epidemici e l'analisi dell'antibioticoresistenza.

L'Italia è rappresentata nel progetto dall'Istituto Superiore di Sanità, che coordina un sistema di sorveglianza nazionale - Enter-Net Italia - che coinvolge numerosi laboratori del Servizio sanitario nazionale.

A partire dall'inizio del 2002 è stata attivata a livello nazionale una struttura parallela al sistema Enter-net, che riguarda la raccolta di dati sugli isolamenti di *Salmonella* spp. da campioni di origine veterinaria, e che prende il nome di rete Enter-vet.

I nodi della rete Enter-Vet sono gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, con il coordinamento del Centro Nazionale di Riferenza per le Salmonellosi. Gli Istituti inviano al Centro di Riferenza i dati relativi alla tipizzazione dei ceppi di *Salmonella* attraverso un sistema informatizzato, assieme ad alcuni stipti (in particolare i ceppi appartenenti ai sierotipi Enteritidis e Typhimurium) per la tipizzazione fagica. Tutti i dati vengono inviati dal Centro di Riferenza all'Istituto Superiore di Sanità.

Durante l'anno 2002, come presupposto essenziale per l'attività di un sistema di sorveglianza di questo tipo, sono stati eseguiti due test interlaboratorio di tipizzazione sierologica delle salmonelle, a cui hanno partecipato tutti i laboratori che inviano dati a Enter-Vet, e che verrà d'ora in poi ripetuto con cadenza annuale.

Durante l'anno 2002 sono stati inviati i dati relativi a 4550 ceppi tipizzati presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Si definisce IZS di Riferimento il laboratorio che ha eseguito la tipizzazione sierologica, in considerazione del fatto che alcuni ceppi vengono tipizzati da laboratori diversi da quello territorialmente competente.

I dati riguardanti gli isolamenti di *Salmonella* divisi per IZS di riferimento e per regione di prelievo sono riassunti nella Tabella 1. Di questi ceppi, il 40,7% derivava da campioni di origine animale (attività diagnostica, piani di monitoraggio), il 51,3 % da alimenti (attività di controllo ufficiale e di autocontrollo), il 6,3% da campioni di tipo ambientale ed il 1,7% da campioni di origine non nota.

La Tabella 2 riassume il numero di ceppi isolati per specie animale.

I grafici 1, 2 e 3 riportano la distribuzione dei principali sierotipi isolati nel 2002 nell'uomo (dati Enter-net), negli animali e negli alimenti derivati. E' immediatamente evidente come sia strettissima la correlazione fra queste tre categorie di campioni, in quanto i sierotipi si ripetono nei tre grafici seppur con frequenze diverse, e con l'eccezione di pochi sierotipi presenti nell'uomo ma non nei campioni di origine veterinaria (Brandenburg, Muenchen, Napoli), o viceversa. Taluni sierotipi, quali S. Gallinarum, appaiono solo in campioni di origine animale in quanto si tratta di ceppi strettamente ospite-adattati in cui non si configura il ciclo zoonotico tipico della maggioranza dei ceppi di *Salmonella*.

Per quanto riguarda i campioni di origine avicola, nel pollo (considerando i campioni di origine animale) il sierotipo più frequentemente isolato è stato S. Virchow (16,7%), seguito da S. Hadar (15,5%) e S. Typhimurium (7,5%). Appare inoltre rilevante la frequenza di isolamento in questa specie animale di S. Enteritidis (7,1%) e di S. Gallinarum (7,1%), in considerazione dell'elevata patogenicità di questi sierotipi rispettivamente per l'uomo e per gli animali.

Nel tacchino, il primo sierotipo isolato da campioni di origine animale è stato S. Blockley (20,3%), seguito da S. Heidelberg (19%), S. Hadar (17,9%) e S. Typhimurium (14,5%).

I grafici 4, 5 e 6 rappresentano la distribuzione dei fagotipi di S. Enteritidis e S. Typhimurium isolate nel pollo, e di S. Typhimurium nel tacchino. E' da notare soprattutto la prevalenza di S. Typhimurium DT 104 in entrambe le specie (27% nel pollo e 28% nel tacchino), che risulta preoccupante in considerazione dell'elevata diffusione di questo fagotipo nei campioni di origine umana, e delle sue caratteristiche di resistenza multipla agli antibiotici. Per quanto riguarda S. Enteritidis, il fagotipo più frequentemente isolato nel pollo è il PT 4 (32%), ma risulta emergente il PT 14b (24%), recentemente segnalato come causa di epidemie in Inghilterra correlate al consumo di uova provenienti dalla Spagna.

Il database Enter-vet, infine, raccoglie anche i dati relativi all'analisi dell'antibioticoresistenza dei ceppi isolati, in particolare nei confronti di un pannello costituito da 16 antimicrobici, riportati in tabella 3.

La tabella 4 riporta i risultati degli antibiogrammi per quanto riguarda i ceppi di *Salmonella* spp. isolati da specie avicole.

Dalla tabella si evince come sia elevata la percentuale di ceppi resistenti a tetraciclina, ampicillina, streptomina, sulfamidici e cloramfenicolo. Tali resistenze sono dovute alla presenza di *S. Typhimurium* DT 104, che presenta appunto il tipico profilo di resistenza ACSSuT. Nel tacchino risulta inoltre frequente la resistenza alla kanamicina (42,16%) e alla neomicina (42,86%), in genere associata a *S. Blockley*. Da notare, inoltre, l'elevata percentuale di ceppi resistenti all'acido nalidixico, che rappresenta un *marker* di diminuita sensibilità nei confronti dei fluorochinoloni, come dimostrato anche dalla presenza, soprattutto nel tacchino, di una quota non irrilevante di ceppi resistenti all'enrofloxacin (5%).

Conclusioni

La produzione di un report con valenza nazionale rappresenta il raggiungimento di un importante obiettivo per questo sistema di sorveglianza che, nonostante sia di recente istituzione, ha portato ad ottimi risultati, grazie alla collaborazione di tutti i centri partecipanti. È importante però sottolineare come dati di questo tipo, che derivano da una sorveglianza di tipo passivo, possano fornire un'immagine talvolta distorta della reale situazione sanitaria della popolazione animale, in quanto possono essere viziati dalla mancanza di una precisa strategia di tipo statistico sottesa all'esecuzione dei campionamenti. Esiste quindi tuttora un'importante lacuna nel sistema di sorveglianza, rappresentata dalla mancanza di un dato preciso sulla prevalenza di infezione da *Salmonella spp.* nei nostri allevamenti, e che risulta indispensabile per l'attuazione e la verifica delle misure di controllo applicate a livello di produzione primaria. L'esecuzione di piani di monitoraggio disegnati a questo scopo appare quindi come necessaria e non più procrastinabile, come viene d'altronde previsto anche dalla normativa comunitaria, ed in particolare dalla revisione della Direttiva 92/177/CEE in corso di emanazione (COM (2001) 452 def.).

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano per la fondamentale collaborazione tutti i partecipanti alla rete Ente-vet: Lucia De Castelli (a), Silvia Tagliabue (b), Stefania Scuota (c), Monica Staffolani (c), Stefano Bilei (d), Elisabetta Di Giannatale (e), Maria Rosaria Carullo (f), Elisa Goffredo (g), Chiara Piraino (h), Antonio Vidili (i)

^a IZS del Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta, ^b IZS della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, ^c IZS dell'Umbria e delle Marche, ^d IZS del Lazio e della Toscana, ^e IZS dell'Abruzzo e del Molise, ^f IZS del Mezzogiorno, ^g IZS della Puglia e Basilicata, ^h IZS della Sicilia, ⁱ IZS della Sardegna

Tabella 1. Isolamenti di Salmonella suddivisi per IZS di riferimento e per regione di prelievo

Istituto Zooprofilattico sperimentale	Sede	Tipizzazioni per IZS di riferimento	Isolamenti per regione di prelievo	
Venezie	Legnaro	1.939	Veneto	1.219
			Friuli Venezia Giulia	58
			Trentino Alto Adige	145
Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta	Torino	13	Piemonte	151
			Liguria	55
			Valle d'aosta	0
Lombardia ed Emilia-Romagna	Brescia	1.752	Emilia-Romagna	1.008
			Lombardia	676
Umbria e marche	Perugia	154	Umbria	152
	Macerata	98	Marche	113
Lazio e Toscana	Roma	201	Toscana	72
			Lazio	127
Abruzzo e molise	Teramo	177	Abruzzo	58
			Molise	126
Mezzogiorno	Portici	111	Calabria	27
			Campania	84
Puglia e Basilicata	Foggia	78	Basilicata	15
			Puglia	85
Sicilia	Palermo	27	Sicilia	6
Sardegna	Sassari	0	Sardegna	5
TOTALE		4.550		4.183*

**Il totale degli isolamenti per IZS di riferimento non coincide con il totale degli isolamenti per regione di prelievo perché, a causa di compilazione incompleta della maschera, per 367 isolamenti non è stato possibile risalire alla regione di prelievo.*

Tabella 2. Numero e percentuale di ceppi isolati per specie animale

Specie	N.	%
Suino	1.292	28,40
Pollo	993	21,82
Tacchino	600	13,19
Bovino	205	4,51
Bovino/Suino	183	4,02
Piccione	90	1,98
Coniglio	80	1,76
Ovino	46	1,01
Faraona	38	0,84
Molluschi	37	0,81
Anatra	35	0,77
Equino	19	0,42
Quaglia	16	0,35
Bufalino	13	0,29
Caprino	2	0,04
Altro	544	11,96
Non noto	357	7,85
Totale	4.550	100

Grafico 1. Distribuzione dei principali sierotipi isolati nell'uomo

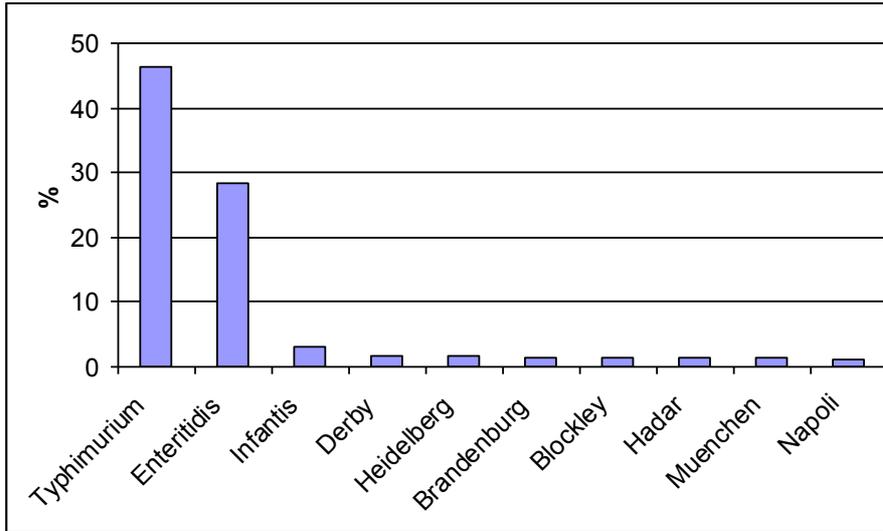


Grafico 2. Distribuzione dei principali sierotipi isolati negli animali

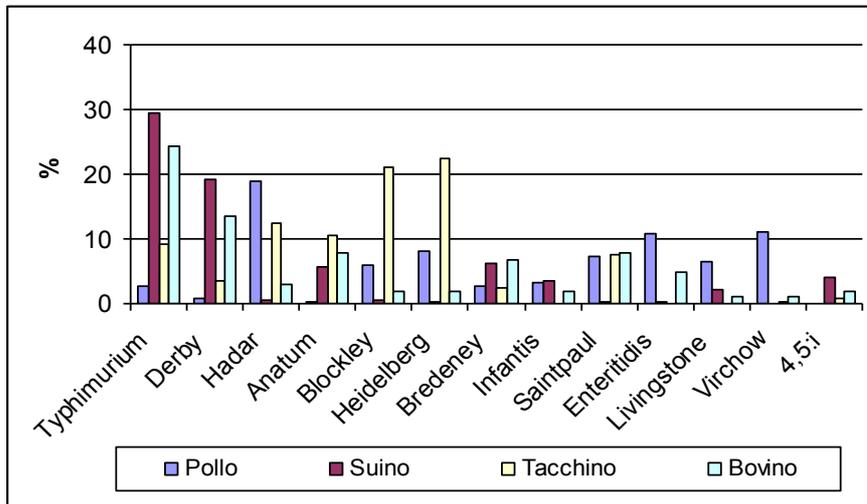


Grafico 3. Distribuzione dei principali sierotipi isolati negli alimenti

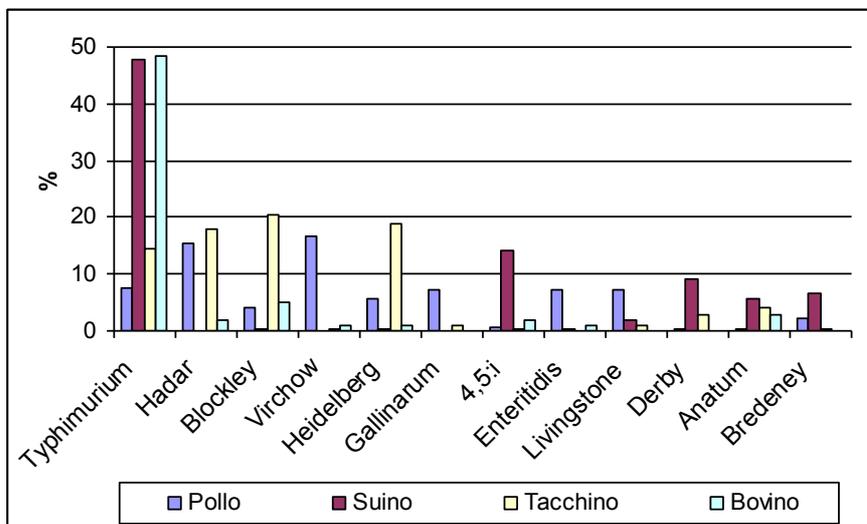


Grafico 4. Distribuzione dei fagotipi S. Enteritidis isolati dal pollo

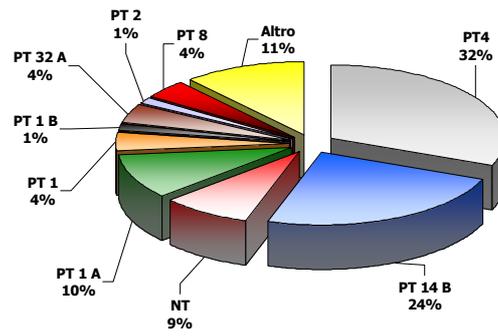


Grafico 5. Distribuzione dei fagotipi S. Typhimurium isolati dal pollo

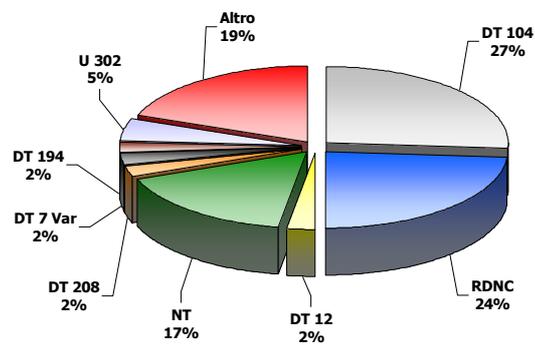


Grafico 6. Distribuzione dei fagotipi S. Typhimurium isolati dal tacchino

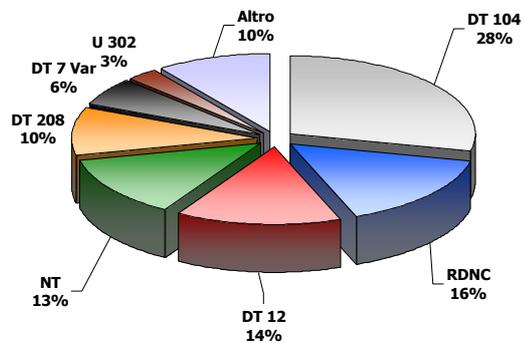


Tabella 3. Antibiotici utilizzati

CL	Colistina
SXT	Sulfametoxazolo-Trimetoprim
K	Kanamicina
GM	Gentamicina
N	Neomicina
CTX	Cefotaxime
AMC	Amoxicillina-Acido Clavulanico
NA	Acido Nalidixico
TE	Tetraciclina
AM	Ampicillina
S	Streptomicina
S-3	Trisulfamidico (sulfonamidi)
C	Cloramfenicolo
CF	Cefalotina
ENR	Enrofloxacin
CIP	Ciprofloxacina

Tabella 4. Antibioticoresistenza nelle specie avicole

	CL	SXT	K	GM	N	CTX	AMC	NA	TE	AM	S	S3	C	CF	ENR	CIP
Pollo	0,61	4,61	6,55	0,75	6,67	0,89	1,80	42,56	30,51	43,58	28,53	48,69	3,88	11,28	2,71	0,00
Tacchino	0,49	9,22	42,16	4,28	42,86	0,24	1,46	66,75	82,78	46,57	69,10	52,26	12,74	13,10	5,01	0,00
Altri avicoli	0,00	10,71	7,62	3,81	6,02	0,00	0,00	35,63	42,53	38,36	15,59	48,87	7,62	11,11	0,00	0,00

RELAZIONE 0e

LE PRINCIPALI CAUSE DI RIFORMA RISCOSTRATE NEI MACELLI AVICOLI

Pasquale Gaspari

Veterinario Ufficiale AUSL di Cesena (FC)

La ricerca era basata sulla verifica di alcuni parametri nei vari macelli avicoli sparsi nel territorio nazionale. Sono stati contattati i veterinari ufficiali che operavano in macelli di polli, tacchini, galline-galletti, faraone, anatre-ocche, quaglie e piccioni. La richiesta era quella di conoscere la percentuale mensile dei volatili giunti morti al macello (DOA), la percentuale mensile dei volatili alienati dal consumo umano da parte del veterinario ufficiale o personale ausiliario e le cause di scarto degli animali.

Per avere dati aggiornati si è preso in considerazione il periodo compreso tra agosto2002/luglio2003. E' stato possibile mettere a confronto il periodo in oggetto con quello precedente, agosto 2001/ luglio 2002.

Mentre la % dei DOA dei polli, galline, faraone nei vari mesi del periodo 2002/2003 ha subito una flessione rispetto al periodo 2001/2002, segnando un netto miglioramento, la percentuale dei DOA dei tacchini è risultata più alta e quindi peggiore rispetto al periodo 2001/2002.

Anche la percentuale annua del Min/Max DOA dei tacchini, rispetto allo stesso periodo 08-2001/07-2002, ha subito un peggioramento, contrariamente a quanto si è verificato nei polli, galline e faraone.

La media annuale degli INCOMMESTIBILI rispetto al periodo 08-2001/07-2002 è diminuita nei polli, galline e faraone, mentre ha subito un aumento considerevole nei tacchini.

L'esito dell'indagine porta a concludere che i provvedimenti intrapresi dalle ditte a salvaguardia del benessere animale, per il tacchino non sono stati sufficienti a neutralizzare gli stress, dovuti prevalentemente agli eccessi climatici di caldo e freddo riscontrati durante il periodo osservato. Tra i parametri del benessere animale devono essere presi in considerazione lo stato sanitario degli allevamenti, la densità nelle gabbie, la temperatura durante il viaggio, il rinfrescamento delle aree di sosta del vivo, gli errori di carico e la distanza dal macello.

Per quanto riguarda le cause di scarto al macello si può dedurre che, in mancanza di emergenza per forme epidemiche, è difficile confrontare le patologie di allevamento con le patologie riscontrate al macello, fatta eccezione per la Malattia di Marek, la colisetticemia e i traumi da carico e trasporto.

La teoria emergente è che il parametro DOA possa essere considerato un elemento di facile rilevazione, utile a identificare lo stato del "Benessere animale".

RELAZIONE 1

INFEZIONI VIRALI ENTERICHE DEI TACCHINOTTI

Y. M. Saif

*Food Animal Health Research Program
Ohio Agricultural Research and Development Center
The Ohio State University
Wooster, Oh 44691*

Traduzione a cura di Dr. A. Lavazza

La sanità ed integrità del tratto gastro-intestinale (GI) assumono un'importanza estrema nella produzione del tacchino commerciale. Il tratto GI rappresenta la più ampia superficie esposta del corpo ed è continuamente bombardato da una serie di agenti infettivi, alcuni dei quali sono in grado di causare malattia.

Gli animali giovani, in particolare, risultano altamente sensibili ad una varietà di patogeni a causa della immaturità del tratto GI e di un'inadeguata risposta immunitaria.

In generale le malattie enteriche possono influenzare la crescita, l'utilizzo del mangime, l'uniformità del gruppo, la suscettibilità ad altre malattie ed i costi di medicazione. Il risultato di tutto ciò si traduce spesso in un grave danno economico.

COMMENTI GENERALI

- Gli agenti infettivi, causa di enterite, più comuni nei tacchinotti commerciali sono virus. Esistono numerosi virus capaci di causare enterite e la maggior parte non sono isolabili *in vitro*.
- La maggior parte delle infezioni virali "singole" esita in una forma clinica lieve o subclinica, mentre le infezioni associate ovvero causate da più virus in combinazione sono molto frequenti e a volte inducono quadri clinici molto gravi caratterizzati da imponenti lesioni, lungo tutto il tratto GI.
- Differenti combinazioni di virus portano a sindromi cliniche differenti e un'ampia varietà di termini è stata utilizzata per descrivere queste forme: *poult enteritis and mortality syndrome (PEMS) spiking mortality, stunting syndrome etc...*
- E' opinione comune che le infezioni virali favoriscano la comparsa di altri patogeni enterici.
- Non è stata dimostrata la trasmissione verticale dei virus enterici anche se in alcuni casi sono stati identificati già a due giorni di età.
- Si è sempre ritenuto che la maggior parte dei virus enterici agisse e moltiplicasse solo a livello enterico ma recentemente si è visto che possono dare origine a viremia e localizzarsi in altri organi e distretti
- I virus che infettano gli enterociti dei villi inducono una iperplasia delle cripte e così facendo possono predisporre gli uccelli all'infezione con quei patogeni che replicano nelle cripte, a seguito di un aumento l'attività mitotica delle cripte
- L'infezione associata di virus che replicano negli enterociti dei villi e delle cripte deprime sia l'attività secretoria che quella di assorbimento, nonché la capacità rigenerativa dell'intestino, causando così un quadro clinico più grave e di maggiore durata.
- Modifiche e mutazioni delle condizioni ambientali, alimentari o della genetica degli animali allevati possono avere un effetto sulla risposta alle infezioni.
- I virus possono andare incontro a mutazioni con conseguente modifica delle caratteristiche di virulenza, tropismo, spettro d'ospite, antigenicità etc.
- C'è sempre la possibilità che virus sconosciuti siano coinvolti come agenti di patologia enterica.

VIRUS ASSOCIATI A ENTERITE

Diversi gruppi di virus sono stati identificati come agenti eziologici di malattia enterica nei tacchinotti. Tra questi vi sono rotavirus, astrovirus, enterovirus, coronavirus, torovirus, reovirus e adenovirus. In aggiunta a questi, altri agenti virali sono stati identificati nel tratto GI ma non è stato possibile correlarne la presenza con quadri patologici enterici ben definiti. Tra questi ricordiamo orthomyxovirus, paramyxovirus, parvovirus, e pseudopicornavirus. Di seguito riportiamo alcune brevi note sui virus associati con malattia enterica

Rotavirus

- Nel tacchino sono stati identificati ed associati a malattia enterica Quattro differenti sierogruppi di rotavirus.
- Nel complesso rappresentano la più comune causa di enterite nei giovani di molte specie animali, tacchino compreso.
- Sono resistenti alle condizioni ambientali.

Astrovirus

- Gli astrovirus sono patogeni enterici riconosciuti nel tacchino e in molte altre specie di mammiferi.
- Sono molto frequenti e comuni nei tacchini commerciali.
- Sono resistenti alle condizioni ambientali.
- Sono virus piccolo ed in alcuni casi mostrano la caratteristica morfologia a stella a 5 o 6 punte.
- Esiste più di un sierotipo.
- Alcuni ceppi sono stati identificati nei tessuti linfoidi e si ritiene possano associarsi a disfunzioni immuniditarie.

Enterovirus

- Si tratta di uno dei più piccoli virus causa di enterite nel tacchino
- Non presentano alcuna caratteristica morfologica di superficie e possono essere confusi con gli astrovirus

Adenovirus

- E' l'agente eziologico dell'enterite emorragica del tacchino.
- Causa immunodepressione nel tacchino.
- Si ritrovano con una certa facilità nel tratto GI di tacchini di età > a 4 settimane.

Coronavirus

- E' l'agente eziologico dell'enterite del tacchino (*blue comb*).
- E' un virus molto labile.
- Probabilmente rappresenta l'agente della forma enterica più devastante del tacchino.
- Presenta un'alta frequenza di mutazione.
- Il coronavirus del tacchino (TCV) si è visto essere antigenicamente correlato al coronavirus della bronchite infettiva (IBV).
- E' stato dimostrato che il coronavirus del bovino è patogeno per il tacchino pur essendo non antigenicamente correlato né con TCV né con IBV

Torovirus

- In uno studio è stato visto che il 30% dei tacchini con sintomatologia enterica erano positivi per tale virus.
- Appartiene alla famiglia delle Coronaviridae
- Morfologicamente simile al coronavirus

Reovirus

- Studi preliminari sul ruolo dei reovirus nel determinismo della sindrome da malassorbimento nel pollo non hanno fornito risultati conclusivi
- Diversi studi nel tacchino hanno portato a risultati discordanti
- Si tratta di un'infezione naturale comune nel pollo e tacchino

Sintomi clinici

- I tacchinotti colpiti hanno di solito un'età compresa fra 1 e 3 settimane.
- I soggetti malati presentano nervosismo, pigolio e tendono ad ammassarsi per il freddo.
- Il consumo di acqua aumenta e talvolta vi è ingestione della lettiera
- La diarrea è una manifestazione comune
- La morbilità è elevata e la mortalità aumenta.
- Malassorbimento e presenza di materiale indigerito sono fenomeni comuni
- Si possono osservare anomalie nutrizionali.
- La guarigione è possibile ma si accompagna alla comparsa di soggetti con anomalie scheletriche, di impiumagione, ritardo di crescita e difformità nel gruppo.

Lesioni anatomo-patologiche

- L'intestino tenue e i ciechi sono distesi con presenza di materiale fluido e gas. Le pareti sono assottigliate e trasparenti.
- Il contenuto ciecale è chiaro.
- Vi è grave disidratazione della carcassa.
- Vi è presenza di alimento indigerito nel gozzo e ventriglio.

Lesioni microscopiche

- Vi è solitamente un aumento di cellule (iper cellularità) nella lamina propria del piccolo intestino.
- Decapitazione dell'apice e vacuolizzazione dell'epitelio dei villi.
- Separazione degli enterociti e desquamazione.
- Atrofia dei villi e distensione della lamina propria.
- Modificazione del rapporto villi/cripte.
- Presenza e adesione di batteri sulla superficie dei villi.

Diagnosi di laboratorio

Svariate tecniche sono utilizzate nei diversi laboratori per la diagnosi di forme virali enteriche; tra queste: microscopia elettronica diretta o immunoelettronmicroscopia, tipizzazione con elettroforesi, immunofluorescenza, immunoperossidasi, isolamento e identificazione, tecniche sierologiche e molecolari (es. RT-PCR).

Epidemiologia

Come indicato in precedenza, i virus enterici sono ampiamente diffusi nei gruppi commerciali in USA. Il loro grado di resistenza alle condizioni ambientali appare variabile e sembra che la via di trasmissione più frequente sia quella oro-fecale.

Patogenesi

I rotavirus solitamente infettano gli enterociti posti all'apice dei villi. Gli enterovirus e gli astrovirus infettano gli enterociti della metà superiore dei villi mentre i coronavirus colpiscono gli enterociti sia dei villi sia delle cripte.

Infezioni associate

- Studi realizzati con coronavirus e *Escherichia coli* dimostrano che il coronavirus da solo causa un modesto ritardo della crescita ma non mortalità, e che *E. Coli* da solo non induce alcuna forma di malattia. Viceversa l'infezione con coronavirus e *E. coli* in associazione esita in grave depressione della crescita e elevata mortalità.
- L'infezione singola con astrovirus o coronavirus induce un quadro di malattia lieve ma al contrario l'infezione associata con entrambi i virus causa una forma clinica grave con elevata mortalità.
- L'associazione di coronavirus, astrovirus, e rotavirus determina depressione nel giro di 24 ore dall'inoculazione e mortalità del 67%.

Immunità

Vi sono prove che la maggior parte dei virus enterici siano immunogeni e i tacchinotti sviluppano immunità attiva che li protegge da reinfezioni. Gli anticorpi passivi di origine materna possono essere utili per alcuni giorni dopo la schiusa allorché il tratto GI è ancora permeabile e gli anticorpi materni possono dal circolo ematico passare nel lume gastroenterico. Poiché la maggior parte di virus enterici infetta il tratto GI, vi è la necessità continua di anticorpi nel lume. Questo si verifica solo dopo che è stata superata la fase acuta della malattia e può essere molto importante per favorire la guarigione e l'eliminazione dei virus

Prevenzione e controllo

Ad esclusione dell'enterite emorragica, che è una malattia sistemica, non vi è alcuna disponibilità di vaccini.

- L'adozione di misure di biosicurezza rappresenta probabilmente la migliore strategia di controllo per prevenire queste forme
- Può essere utile adottare terapie di supporto
- Una terapia antibiotica finalizzata a prevenire e trattare infezioni batteriche secondarie in qualche caso può dare dei benefici.

CONCLUSIONI

- Le malattie enteriche hanno un impatto economico rilevante sulla produzione di tacchini commerciali
- I virus sono la principale causa di malattia enterica nei tacchinotti
- Nei tacchini commerciali sono facilmente identificabili tutta una serie di virus
- L'epidemiologia e la patogenesi dei diversi virus non sono costanti
- La morbilità è, di solito, elevata, ma la mortalità può variare in modo considerevole
- Le infezioni associate sono molto comuni e determinano un'ampia variabilità di sintomi, lesioni ed esito finale.

RELAZIONE 2

PANORAMICA DI MALATTIE BATTERICHE FUNGINE E PARASSITARIE IN GIOVANI TACCHINI

H. L. Shivaprasad

California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Fresno Branch
School of Veterinary Medicine, University of California, Davis
2789 S. Orange Avenue, Fresno, CA 93725 USA
E-mail: hshivaprasad@ucdavis.edu

Traduzione a cura di Dr. L.J. Vinco

Giovani tacchini, d'età inferiore a 7 settimane, sono più sensibili a svariate malattie infettive e non infettive, rispetto a tacchini di oltre 7 settimane d'età.

Quasi due terzi dei tacchini conferiti a scopo diagnostico alle sezioni di Fresno e Turlock del California Animal Health and Food Safety laboratory system (CAHFS) tra il 1991 ed il 2001 avevano un'età compresa tra 1 e 49 giorni (Tabella. 1).

Tabella 1. Età numero di conferimenti e numero di tacchini esaminati tra 1991-2001

Età (gg)	# Conferimenti (%)		# Tacchini (%)	
0 - 1	496	(8.4)	3792	(10.6)
2 - 49	2796	(47.6)	19319	(54.1)
50 - 130	1871	(31.9)	9748	(27.3)
≥ 131	482	(8.2)	1706	(4.8)
Sconosciuta	227	(3.9)	1141	(3.2)
Totale	5872	100	35706	100

Le malattie identificate in questi animali erano sostenute da svariati agenti eziologici virali batterici fungini e parassitari. L'incidenza di queste malattie nei tacchini commerciali è influenzata da vari fattori. Tra questi è compreso la scadente conduzione e ricovero, malnutrizione, malattie concomitanti, immunodepressione, sbalzi termici, selezione genetica, salute dei riproduttori, e soprattutto la mancanza di biosicurezza.

La scadente conduzione può riferirsi al sovraffollamento, insufficiente vuoto sanitario, pulizia e disinfezione inadeguata, rottura d'attrezzatura, mancanza di una corretta ventilazione ed illuminazione, scadente qualità della lettiera, alimentazione, acqua, ed inadeguata vaccinazione, ecc.

La mancanza di biosicurezza è spesso causa di trasmissione di malattia da un allevamento ad un altro o da un capannone all'altro nell'ambito di una stessa azienda.

Personale, attrezzatura, mangime, roditori, rettili, uccelli selvatici ed animali randagi possono esser veicolo di malattia.

Temperature estreme, eccessivamente alte o basse possono risultare dannose per gli animali.

Selezione genetica rivolta ad accelerare gli incrementi ponderali possono ripercuotersi negativamente sulla resistenza genetica alle malattie.

Non è nell'intenzione di questa pubblicazione trattare i vari fattori predisponenti di malattia; per uno studio più approfondito si consiglia al lettore di consultare pubblicazioni e testi più specifici in materia.

MALATTIE BATTERICHE

Le malattie batteriche sono state le malattie più comunemente viste nei tacchini conferiti al CAHFS tra il 1989 ed il 2001 (Tabella 2). I batteri riscontrati sono stati i seguenti: *E. coli*, *Salmonella sp.*, *B. avium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Mycoplasma meleagridis*, *Pseudomonas aeruginosa*, ecc. Altri batteri responsabili occasionalmente di malattia in uccelli più giovani sono *Streptococcus bovis* (*Streptococcus gallolyticus?*), *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella haemolytica-like* (*Gallibacterium anatis*), *M. iowae*, ecc. Batteri come *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* ed *Erysipelothrix rhusiopathiae* sono importanti ma causano malattia solo in tacchini di oltre 7 settimane di età.

Segni clinici mortalità e morbilità in uccelli dovuto a batteri dipendono dal tipo e dalle specie di battere coinvolto, fattore di virulenza, la sede di infezione e la possibile influenza dei fattori predisponenti sopradescritti.

I segni clinici più comunemente descritti dai clienti includono anoressia, letargia, feci molli, riluttanza a muoversi, caduta sulle gambe, sintomi nervosi, difficoltà di respiro ed aumentata mortalità e morbilità.

Colibacillosi: la colibacillosi è stata la malattia più frequentemente diagnosticata tra le malattie infettive e non descritte nel sommario delle malattie del tacchino diagnosticate tra il 1989 ed il 2001 al CHFS (tabella 2).

La colibacillosi è il termine usato per indicare qualsiasi infezione sistemica o localizzata sostenuta da *E.coli*. Queste comprendono la colisetticemia, aerosacculite, cellulite, osteomielite/sinovite, sindrome della testa gonfia, onfalite, enterite, ecc.

La colisetticemia è una delle più comuni manifestazioni dell'infezione da *E.coli* in giovani tacchini. E' caratterizzata da pericardite fibrinosa, aerosacculite, pleurite, periepatite, sinovite ed epatosplenomegalia. La diffusione di *E.coli* attraverso l'ombelico non ancora cicatrizzato può portare ad infiammazione dell'ombelico (onfalite) e del sacco vitellino. Le lesioni macroscopiche dell'onfalite possono consistere in un ombelico ingrossato e scuro ricoperto in superficie da essudato fibrinoso. Lesioni del sacco vitellino potranno consistere

nella presenza di un essudato liquido o denso giallastro con fiocchi di fibrina nei sacchi vitellini stessi. *E. coli* può causare inoltre sinovite e osteomielite nei tacchinotti che hanno subito uno scadente taglio delle unghie nel qual caso i cuscinetti plantari si presenteranno infiammati e conteranno al loro interno essudato purulento giallo paglierino.

Un'altra manifestazione di colibacillosi che non ha ricevuto ancora molta attenzione è l'enterite causata da ceppi AEEC (*Attaching and Effacing E. coli*). Numerosi casi di AEEC in giovani tacchini sono stati diagnosticati tra il 1989 ed il 2003. In uno studio svolto su 75 casi scelti di AEEC in giovani tacchini tra il 1995 ed il 2000 l'età media dei colpiti era di 29 giorni. In questi casi la sede primaria di insorgenza del *E. coli* era rappresentata dai cechi. Le lesioni consistevano in un ingrossamento dei cechi con contenuto schiumoso ed *E. coli* è stato isolato da molti di questi casi. Il gene responsabile dell'adesione, che è stato associato alla virulenza degli AEEC, fu identificato nel 10% di questi *E. coli*. Recentemente è stato dimostrato che infezioni miste con virus, come coronavirus e AEEC in tacchinotti può portare ad alta mortalità.

Tabella 2. Riassunto della frequenza relativa di malattie del tacchino diagnosticate in California tra il 1989-2001

Tipo di malattia	Totale	%	Media/mese	SD	Media/anno
Colibacillosis	2678	16.69	17.17	8.54	206.00
Poult Enteritis	1857	11.57	11.90	6.39	142.85
Coryza (<i>B. avium</i>)	1119	6.97	7.17	5.57	86.08
Other/Eosin. Enteritis	1036	6.46	6.64	4.13	79.69
Crop Mycosis	1033	6.44	6.62	3.97	79.46
Miscellaneous	933	5.81	7.07	4.70	84.80
Other/Septicemia	755	4.70	5.72	3.73	68.63
Hemorrhagic Enteritis	684	4.26	4.38	3.52	52.62
Arthritis/Tenosynovitis	672	4.19	4.67	3.41	56.00
Coccidiosis	484	3.02	3.10	2.28	37.23
ORT	450	2.80	3.41	3.55	40.90
Omphalitis (Yolk Sac)	423	2.64	2.71	2.30	32.54
MM	412	2.57	2.64	3.64	31.69
Cholera	406	2.53	2.62	2.65	31.43
Aspergillosis	406	2.53	2.60	2.67	31.23
Newcastle Disease	383	2.39	2.46	3.08	29.46
Leg Disorders (TD, etc)	379	2.36	2.43	3.43	29.15
Turkey Viral Hepatitis	307	1.91	2.13	2.09	23.62
Necrotic Enteritis	296	1.84	2.06	1.82	24.67
Roundheart Dis.	224	1.40	1.44	1.65	17.23
Salmonellosis	220	1.37	1.41	1.66	16.92
Ricketts	212	1.32	1.44	2.32	17.67
MS	175	1.09	1.12	1.79	13.46
MG	165	1.03	1.06	1.45	12.69
Toxicity	132	0.82	1.00	1.16	12.00
Erysipelas	85	0.53	0.54	0.99	6.54
Pox	49	0.31	0.37	0.86	4.45
Blackhead	34	0.21	0.22	0.54	2.62
Encephalomalacia	33	0.21	0.25	0.53	3.00
Avian Influenza	7	0.04	0.04	0.24	0.54

Salmonellosi: la salmonellosi è un ampio gruppo di malattie acute o croniche dei volatili sostenuto da uno o più membri del genere salmonella. I tacchinotti sono altamente sensibili alla pullorosi e tifosi sostenute *S.pullorum* ed *S.gallinarum* rispettivamente. Tuttavia, queste due malattie non sono state segnalate nei tacchini commerciali negli Stati Uniti da oltre 30 anni. Eccetto la *S.arizonae* che causa grave tifite varie altre specie di salmonella vengono comunemente isolate dall'intestino di tacchinotti. Il significato di ciò è difficile da determinare. Tuttavia, l'isolamento di salmonelle da vari organi tra cui fegato pericardio, sacchi aerei, sacco vitellino, articolazioni, cervello eccetera può essere significativo e causa di segni clinici e mortalità. La frequenza relativa di casi isolamento di salmonella da organi diversi dall'intestino è stata molto bassa ed è risultata 21ma come causa in una lista di 30 categorie di malattie considerate nel sommario della CAHFS (tabella 2) relativamente al periodo

1991-92, periodo in cui erano disponibili dati sulla sierotipizzazione (tabella3) *S.heidelberg* è stato il più comunemente isolato, seguito da *S.schwarzengrund* e *S.senftenberg*.

Tuttavia negli ultimi due anni nel nostro laboratorio vi è stato un aumento di incidenza di salmonellosi principalmente dovuto alla *S.arizonae*. L'arizoonosi è una malattia setticemica principalmente dei giovani tacchini caratterizzata da diarrea, impastamento della piuma attorno alla cloaca, cecità, paralisi, torcicollo, convulsione ed aumentata mortalità. La sorgente dell'infezione erano i riproduttori che hanno trasmesso il battere alla progenie attraverso le uova.

Tabella 3. Sierotipi di salmonella isolati dall'intestino ed altri organi di tacchino tra il 1991-92 qI CAFHS, Fresno, California

Sierotipo	Organi		Intestino		Totale	
	1991	1992	1991	1992	1991	1992
S. heidelberg	22	17	43	49	65	66
S. schwarzengrund	3	0	17	21	20	21
S. senftenberg	7	3	16	19	23	22
S. kottbus	4	2	16	2	20	4
S. kentucky	6	0	10	11	16	11
S. broughton	0	0	8	1	8	1
S. bredeny	0	0	7	23	7	23
S. blakley	1	3	5	0	6	4
S. typhimurium	0	0	0	4	0	4
Altri sierotipi	1	8	10	15	11	23
Totale	44	31	132	145	176	176

Bordetellosi: la Bordetellosi, comunemente chiamata coriza del tacchino, è una malattia acuta altamente contagiosa del primo tratto respiratorio dei tacchini sostenuta da *Bordetella avium*. La malattia è caratterizzata da scolo oculo-nasale starnuto, edema sottomandibolare, dispnea, collasso tracheale, crescita stentata e predisposizione ad altre malattie infettive. La bordetellosi è una delle malattie più diagnosticate in California ed è risultato quarto in una lista di 30 categorie di malattie nella relazione riassuntiva della CAHFS. Dal momento che la terapia nei riguardi della bordetellosi non è efficace strette misure di biosicurezza, lavaggio a fondo di tutte le superfici, disinfezione dell'impianto di abbeverata e della mangiatoie dovrebbe aiutare a controllare e prevenire la malattia.

Malattie da clostridi: *Clostridium perfringens* è l'agente eziologico della enterite necrotica, una malattia acuta dei tacchini principalmente di età dalle 5 alle 10 settimane. La malattia è caratterizzata da necrosi della mucosa intestinale ed occasionalmente da foci necrotici nel fegato. Altre malattie concomitanti quali la coccidiosi e l'enterite emorragica in associazione con uno scadente management possono favorire l'eccessiva crescita di clostridi predisponendo gli uccelli all'enterite necrotica. La genotipizzazione con la PCR di 15 isolamenti di *C.perfringens* dall'intestino dei tacchini con enterite necrotica ha dimostrato che appartenevano tutti al tipo A.

Staphylococcosi: artrite sinovite e osteomielite sono soprattutto comuni in tacchinotti di età compresa tra i 2 ed i 17 giorni e sostenuti primariamente da *Staphylococcus aureus*. La maggior parte di questi casi erano in relazione con uno scadente taglio dell'unghia. Con l'avvento della tecnica che si avvale del microonde per il taglio delle unghie l'incidenza di sinovite è calata drasticamente. Altre specie quali *S.intermedius* ed *S.hyicus* sono state inoltre isolate in occasione di sinoviti ed osteomieliti. I tacchinotti affetti da sinovite ed osteomielite presentavano dall'anamnesi segni clinici di incapacità di locomozione dovuta a ingrossamento dei cuscinetti plantari e dell'articolazione del garretto. Frequentemente vi è anche un coinvolgimento del fegato che appare verdastro. Anche l'infezione del sacco vitellino è stata associata ad infezioni da stafilococco.

Streptococcosi: setticemia in giovani tacchinotti caratterizzata da aumentata mortalità dovuta ad epatite e splenite è stata associata a *Streptococcus bovis* (*Streptococcus gallolyticus* ?). In giovani tacchini è stato osservato infezione del sacco vitellino e sinovite/osteomielite dovute a *Streptococcus sp. Enterococcus sp.*

Micoplasmosi: aerosacculite sostenuta da *Mycoplasma meleagridis* (MM) è comune in giovani tacchinotti in gruppi dove i riproduttori erano positivi per MM. *Mycoplasma iowae* può causare una ridotta schiudubilità e mortalità embrionale tardiva in tacchini. Malattie sostenute da *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* sono rare in tacchini di età inferiore a 7 settimane.

Altri batteri: *Pseudomonas aeruginosa* è stato comunemente isolato da uova ed embrioni e da sacchi vitellini ombelico e articolazioni ed occasionalmente da altri organi di giovani tacchinotti con malattia clinicamente manifesta. L'isolamento di *P.aeruginosa* da giovani tacchinotti è stata messa in relazione a scadenti condizioni sanitarie nell'incubatoio e / o sottocappa.

Analogamente *Klebsiella pneumoniae* è anch'esso ritenuto un contaminante ambientale che è stato isolato da uova, sacchi vitellini, sacchi aerei, articolazioni eccetera di giovani tacchini. In tacchini di età inferiore e superiore

ai 49 giorni di età batteri *Pasteurella haemolytica-like* (*Gallibacterium anatis*) sono stati isolati dai seni trachea polmoni e sacchi aerei di uccelli con lesioni.

P. multocida e *Ornithobacterium rhinotracheale* raramente sono ritenuti responsabili di malattie in giovani tacchini. *Erysipelothrix rhusiopathiae* occasionalmente può causare setticemia ed incremento di mortalità in giovani tacchini. Recentemente *E. rhusiopathiae* è stato isolato da articolazioni di tacchinotti di 2/3 giorni di età associato a scadente taglio delle unghie.

Batteri *Neisseria like* sono stati isolati nei polmoni di giovani tacchini affetti da grave polmonite. Batteri *spirochete like* sono pure stati reperiti nei cechi di giovani tacchini ma il loro significato non è ancora stato stabilito.

In Israele *Chlamydophila psittaci* è stata descritta associata a sintomatologia respiratoria con polmonite pericardite e sinovite in giovani tacchini.

MALATTIE FUNGINE

Aspergillosi e micosi del gozzo sono alcune delle più comuni malattie dei giovani tacchini (tabella 2). Altri funghi come la *Dactylaria gallopava* sono stati osservati sporadicamente associati ad encefalite od altra mortalità in tacchinotti.

Aspergillosi: Aspergillosi chiamata anche polmonite da chioccia è una malattia micotica di tacchinotti e giovani tacchini sostenuta da *Aspergillus sp.* principalmente *aspergillus fumigatus*. Ma altre specie di aspergillo come *A. flavus* possono causare la malattia. Come sottolinea il nome polmonite da chioccia una contaminazione ambientale notevole di spore di aspergillo nelle incubatrici o nella lettiera delle pulcinaie, predispone gli uccelli alla aspergillosi. La malattia è caratterizzata principalmente da sintomi respiratori, ma possono essere descritti anche sintomi neurologici come pure oculari. Le lesioni consistono in noduli bianchi o di colore giallo paglierino nei polmoni ed occasionalmente noduli giallo paglierini nel cervello ed opacità corneale.

Micosi del gozzo: la micosi del gozzo è una delle più frequenti malattie diagnosticate nei giovani tacchini. È classificata come la sesta malattia più comune in una lista di 30 categorie di malattie descritte nel sommario della CAHFS (tabella 2) La micosi del gozzo è una malattia micotica del gozzo ed occasionalmente dell'esofago e della cavità orale. È sostenuta principalmente da un lievito, *Candida albicans*. Anche altre specie di candida sono state messe in relazione con la micosi del gozzo. La micosi del gozzo veniva principalmente descritta in associazione a malattie batteriche virali e parassitarie concomitanti. È stato anche associato a scarsa disinfezione, debolezza, immunosoppressione, trattamenti antibiotici prolungati eccetera.

MALATTIE PARASSITARIE

I parassiti comprendono vermi tondi come *Ascaridia dissimilis* e protozoi come *Histomonas meleagridis*, varie specie di coccidi *Cochlosoma anatis*, *Cryptosporidia meleagridis* e *C. baileyi*, *Hexamita (spironucleus) sp.*, *Trichomonas sp.*, e *amoeba*.

Vermi Tondi: in conseguenza dell'aumentato costo della lettiera alcuni gruppi integrati riutilizzano la lettiera portando di conseguenza ad un sovraccarico di parassiti quali la *Ascaridia dissimilis*. *Ascaridia dissimilis* è uno dei parassiti più frequentemente trovati nel piccolo intestino dei tacchini. In numero ridotto probabilmente non causano gravi conseguenze ma stimolano una proliferazione eosinofila nell'intestino il che porta ad una enterite eosinofila (tabella 2). Questi sono stati anche messi in relazione con l'enterite necrotica oltre a causare un aumento di fegati rigettati in sede di ispezione al macello. Quest'ultimo è dovuto alla presenza di foci bianchi nel fegato creati dalla migrazione delle larve di *Ascaridia dissimilis* attraverso il fegato.

Istomoniasi: detto anche testa nera è una malattia protozoaria causata da *Hystomonas meleagridis* che è caratterizzata da feci color zolfo, anoressia, depressione, ed aumentata mortalità. Mortalità fino a 60/80 % sono state osservate in alcuni gruppi di tacchini negli USA. Ad aggravare il problema vi è la mancanza di un trattamento terapeutico adeguato. La malattia è più comune in uccelli di età tra le 6 e le 12 settimane. Lesioni da istomoniasi comprendono notevole ingrossamento dei cechi, con tappi gialli e aree di necrosi nel fegato. Altri organi quali la borsa di Fabrizio, la milza, il rene, pancreas, proventricolo, polmoni e peritoneo sono stati descritti in recenti casi.

Coccidiosi: la coccidiosi nei tacchini non è drammatica come nel pollo, ed è stata controllata in larga parte con un prudente impiego di farmaci quali ionofori. Ma la coccidiosi sostenuta dalle specie *Eimeria adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. meleagrimitis* ed altri vengono tuttora comunemente viste nei giovani tacchini. La coccidiosi è risultata la decima malattia più frequentemente diagnosticata tra la categoria di 30 malattie (tabella 2) è stata associata a feci molli peggioramento dell'indice di conversione, ridotto incremento ponderale ed enterite. La coccidiosi può inoltre predisporre all'enterite necrotica.

Criptosporidiosi: *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* vengono trovati adesi agli enterociti nel piccolo intestino di giovani tacchini in associazione con virus enterici e batteri con conseguente enterite. Il loro ruolo nell'insorgenza dell'enterite non è ben noto. Analogamente criptosporidi sono stati osservati nella borsa di Fabrizio dei giovani tacchini ma il loro significato è sconosciuto. Criptosporidi si possono anche trovare nel tratto respiratorio (seni, trachea e bronchi) di tacchini più vecchi ed è stato associato con sintomatologia respiratoria.

Coccciosomiasi *Cochlosoma anatis* è un protozoo flagellato che viene reperito principalmente nel duodeno e nel

digiuno ed è stato associato a diarrea ed enterite nei tacchinotti.

Altri protozoi: trichomonadi, amebe ed hexamita vengono frequentemente trovati in grosse quantità nei ciechi dei tacchinotti con enterite. Tuttavia il ruolo di questi protozoi nel causare l'enterite nei tacchinotti non è conosciuto.

Bibliografia:

1. Pakpinyo, S., D. H. Ley, H. J. Barnes, J. P. Vaillancourt, J. S. Guy. Enhancement of Enteropathogenic *Escherichia coli* Pathogenicity in Young Turkeys by Concurrent Turkey Coronavirus Infection. *Avian Dis.* 47:396-405, 2003.
2. Saif, Y. M., H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald and D. E. Swayne. *Diseases of Poultry*, 11th edition, Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003.
3. Shivaprasad, H. L., R. P. Chin, R. Crespo, P. R. Woolcock, B. Charlton, G. Cooper and A. A. Bickford. Turkey disease trends between 1989 and 2001 in California. *Proceedings*, 4th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. Pp 40 – 42. May 2002.
4. Shivaprasad, H. L., B. Daft, R. Crespo, R. P. Chin, and D. Read. Attaching and effacing *E. coli* in avian Species. *Proceedings*, 43rd American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians conference, Birmingham, AL, pp 54. October 2000.
5. Weisman, Y., A. Lublin, S. Mechani, H. Yuval and M. Malkinson. *Chlamydia psittaci* – An emerging pathogen in turkeys and chickens. *Proceedings*, 46th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA. Pp 56, March 1997.

RELAZIONE 3

ALIMENTAZIONE E GESTIONE DEL TACCHINOTTO

Cliff Nixey

Direttore del servizio tecnico della British United Turkeys

Traduzione a cura di Dr. L. Montella

Ogni buon allevatore sa bene che le prime settimane di vita sono fondamentali per la buona riuscita del ciclo. Secondo la mia personale esperienza ad esempio, la maggior parte delle volte che sono stato chiamato per valutare problemi di scarsa crescita dei tacchini, cioè di soggetti che non raggiungevano il peso previsto per quella determinata età, ho constatato che erano stati sottopeso già in pulcinaia. Certo, a volte è possibile un recupero nel periodo successivo, ma devono esserci condizioni di alimentazione, sanità e gestione ottimali, e ciò avviene assai raramente.

Nelle prime settimane di vita, la crescita dei tacchinotti BUT big 6 è fenomenale. Infatti a 5 settimane il peso della nascita è aumentato di 32 volte - secondo lo standard BUT del 2002-: se confrontiamo questo dato alla crescita di un bambino che alla nascita pesi 3,5kg, a 5 settimane peserebbe 112 kg! Non sorprende quindi che il tacchinotto sia molto sensibile a qualsiasi problema durante le prime settimane di vita.

Vorrei esaminare di seguito alcuni dei fattori, quali la alimentazione, i programmi luminosi, la gestione e le temperature del capannone, che secondo me influenzano la crescita del tacchinotto.

1) Formulazione

Gli aspetti fondamentali riguardano gli amminoacidi digeribili ed il rapporto di energia metabolizzabile (ME), oltre che il corretto rapporto tra calcio e fosforo. Mentre il primo ha una notevole influenza sui tassi di crescita, l'ultimo invece è strettamente legato alla sanità degli arti. Suggerirei i livelli riportati in Tabella 1 per ottenere i risultati migliori

Tabella 1. Livelli nutrizionali suggeriti

Forma del mangime	Età			
	0 – 3 settimane		3 – 8 settimane	
	macinato		Pellet da 3.0 mm	
	Nutriente (g/MJ ME)	Esempio Dieta %	Nutriente (g/MJ ME)	Esempio Dieta %
Dig. Lisina	1.41	1.72	1.20	1.53
Dig. Met	0.50	0.61	0.46	0.59
Dig. TSAA	0.93	1.13	0.85	1.09
Dig. Trip	0.23	0.28	0.20	0.25
Dig. Treo	0.87	1.06	0.74	0.94
Dig. Arg.	1.54	1.88	1.32	1.69
Calcio	1.14	1.40	1.04	1.33
P disp.	0.64	0.78	0.58	0.75
ME (Kcal/kg)		2920		3059

2) Assunzione di alimento

Credo che spesso i fattori che influenzano la assunzione del cibo siano più importanti della formulazione stessa, come ad esempio possiamo vedere in Tabella 2, dove si riporta una prova fatta con il medesimo mangime che aveva due diverse forme fisiche (sfarinato o pellet).

Per ottenere la stessa riduzione di peso del 23% tramite la formulazione bisognerebbe mettere in atto dei cambiamenti radicali, mentre qui abbiamo solamente una diversa forma fisica. Non bisogna poi confondere il mangime macinato (che è stato previamente pellettato) con lo sfarinato, che invece deprime decisamente la crescita.

E' fondamentale anche che ogni soggetto abbia facile accesso ad acqua e mangime: ad esempio è utile mettere nei primi giorni dei vassoi con il mangime dentro al cerchio, per facilitarne la assunzione: in genere questo artificio da solo permette un aumento di crescita fino all'8%.

E' anche importante al momento dell'accasamento avere le mangiatoie colme, anche se ciò significa un certo spreco di mangime, ma lo scopo è sempre quello di facilitare al tacchinotto il riconoscimento del cibo; di fatto poi si tratta solo di una piccolissima percentuale del mangime totale consumato

Tabella 2. Confronto tra la crescita del tacchino (in gr) alimentato con due diverse forme fisiche del medesimo mangime (Nixey 1989)

età (giorni)	macinato	sfarinato	% di riduzione con lo sfarinato
1	55.8	55.7	0.3
7	139.7	117.4	16.0
14	318.0	246.6	22.5
21	596.7	451.7	24.3
28	1017.4	780.6	23.3

3) Programmi luminosi

I programmi luminosi hanno una influenza notevole sulla crescita precoce, ed i migliori risultati in campo si notano con programmi a luce intermittente a partire dal secondo giorno di accasamento. Alcune ditte, in particolare in Francia, tengono un programma a luce intermittente almeno per la prima settimana di età od anche oltre, con 3 ore di luce e 3 di buio. Si nota un miglioramento legato ad un calo dei soggetti che si ribaltano e che non si appastano, con pesi maggiori e migliore uniformità dei gruppi.

Comunque è poi importante che il tacchino venga sottoposto ad un programma che preveda almeno 8 ore di buio continuo, infatti spesso programmi con luce continua sono associati ad un aumento dei problemi di gambe

4) Temperature

Nel momento della messa a pollaio bisogna dare al tacchinotto un'area dotata di un range termico tale da permettergli di scegliere tra diverse temperature, e determinare da solo quale sia la zona di benessere.

Idealmente dovremmo avere temperature di 38C° sotto cappa e di 25-26 C° in ambiente, mentre spesso vediamo T ambientali più elevate

In seguito la T ambientale deve diminuire gradualmente, tranne che nel caso in cui il gruppo manifesti, con l'addensarsi dei tacchinotti, la necessità di una T maggiore (come avviene nel caso di rinotracheite): allora si riscalderà nuovamente l'ambiente fino alla risoluzione del problema.

Se i tacchinotti sono stati allevati con T troppo alte spesso si notano le ali con penne remiganti primarie sollevate dal corpo.

5) Gestione

Il primo indicatore di una cattiva gestione ambientale durante le prime settimane di vita resta la pododermatite del plantare. La causa principale è la presenza di una lettiera collosa nei primissimi giorni di vita, che potrebbe derivare da un numero eccessivo di tacchinotti per cerchio oppure dal loro permanere sui bordi del cerchi troppo a lungo. E' anche importante evitare perdite di acqua dagli abbeveratoi e provvedere ad un frequente pulizia della lettiera

Anche la alimentazione entra in gioco in questo contesto; infatti un consumo di acqua eccessivo potrebbe essere causato da un contenuto elevato di sodio e/o potassio nel mangime. Quest'ultimo potrebbe derivare da un eccesso di soia nel mangime. La appiccicosità delle feci aumenta anche con l'aumentare del grasso, in particolare se di cattiva qualità: da lavori recenti (Sell e Hanyu) sappiamo, infatti, che il tacchinotto non digerisce bene i grassi

Per concludere ripetiamo, ribaltandola, l'asserzione iniziale: i gruppi di tacchini che vanno bene in campo hanno sempre avuto una buona pulcinaia

RELAZIONE 4

PREVALENZA DELLE MALATTIE BATTERICHE E VIRALI NEI TACCHINOTTI IN ITALIA

G. Tosi¹, M. Crudi², L. Fiorentini¹, F. Paganelli¹, P. Massi¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna ²Veterinario Dipendente Azienda Integrata

Premessa

Allo scopo di raccogliere dati di campo sulla prevalenza delle principali patologie infettive del tacchino durante il primo mese di vita è stato condotto un monitoraggio su 18 gruppi di tacchini da carne distribuiti in varie zone della Romagna e appartenenti alla medesima azienda.

I gruppi avevano una consistenza media di 12000 capi. I soggetti provenivano dallo stesso incubatoio.

Il piano vaccinale adottato nei gruppi esaminati era, nel corso dei primi 30 giorni di vita, il seguente: vaccinazione a 1 giorno (con metodo spray) nei confronti di malattia di Newcastle (ND) e rinotracheite infettiva (TRT); in alcuni gruppi la vaccinazione nei riguardi della TRT veniva eseguita a 6 giorni di età (in coincidenza del debeccaggio) per via oculare; somministrazione, a 20 giorni di età, di un vaccino inattivato quadrivalente per la profilassi immunizzante nei confronti di Malattia di Newcastle, enterite emorragica, *Escherichia coli* e *Riemerella anatipestifer*.

Le indagini di laboratorio venivano condotte su soggetti vivi e morti conferiti dal veterinario aziendale. Oltre all'esecuzione di esami anatomo-patologici, venivano svolti i seguenti accertamenti di laboratorio:

- 1 giorno di vita: esame batteriologico (comprensivo della ricerca di *Salmonella* spp.), esami sierologici per la rilevazione di anticorpi nei confronti dei seguenti agenti eziologici: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM), anemia infettiva del pollo (CIA), bronchite infettiva (IB), bursite infettiva (IBD), malattia di Newcastle (ND), influenza aviare; esame mediante metodica PCR nei riguardi di MG e MS.
- 8 giorni di vita: microscopia elettronica (M.E.) da contenuto intestinale per l'evidenziazione di virus enterici.
- 15 giorni di vita: M.E.; esame parassitologico, esame batteriologico (compresa la ricerca di clostridi e di *Campylobacter* spp.), PCR nei confronti del virus dell'anemia infettiva del pollo (CIAV).
- 25 giorni di vita: M.E., esame parassitologico.
- 30 giorni di vita: esame batteriologico (compresa la ricerca di *Clostridium* spp. e di *Campylobacter* spp.); esame parassitologico.

RISULTATI DEL MONITORAGGIO

1 giorno

Esami batteriologici: nei primissimi giorni di vita, oltre a patologie legate allo stress da trasporto, la mortalità, in tutti i gruppi esaminati, è causata da onfaliti batteriche. Tranne qualche raro caso di isolamento di stafilococchi e *Pseudomonas aeruginosa*, gli esami batteriologici hanno rilevato la contaminazione del sacco vitellino da *Escherichia coli*. Spesso l'infezione si traduce in una vera e propria colisettemia con comparsa di lesioni a carattere fibrinoso (pericardite e periepatite) e di splenomegalia. E' da sottolineare la diffusione di ceppi di *E.coli* caratterizzati da una spiccata antibiotico-resistenza, in vitro, nei confronti di numerosi principi attivi. La sierotipizzazione dei ceppi isolati ha consentito di evidenziare con maggiore frequenza i sierotipi O8 e O21. Non mancano ceppi di *E.coli* non sierotipizzabili in quanto diversi dai principali gruppi antigenici noti finora. La tipizzazione molecolare dei ceppi isolati non ha evidenziato la presenza di geni codificanti verotossine. Nessuno dei gruppi testati ha presentato infezione da *Salmonella* spp.

Esami sierologici e mediante PCR: in un gruppo è stata rilevata, attraverso la metodica PCR, una positività nei confronti di MG non associata alla presenza di anticorpi. Al contrario, tre gruppi si presentavano positivi sierologicamente (sia alla sieroaagglutinazione rapida che al metodo ELISA) nei confronti di MS risultando invece negativi alla tecnica PCR. Nessuno tra i gruppi controllati ha presentato positività sierologiche nei confronti di MM. Sono state rilevate, in un gruppo, positività sierologiche al virus dell'anemia infettiva del pollo. In tre gruppi gli esami sierologici hanno evidenziato positività nei confronti del virus della bursite infettiva, mentre sei gruppi presentavano titoli anticorpali nei riguardi del virus della bronchite infettiva aviare.

8 giorni

Predominano le forme di enterite virale che verranno discusse in un apposito capitolo.

Periodo 15-30 giorni

In alcuni gruppi (5/18) persistono forme enteriche con evidenziazione di agenti virali. Durante questo periodo si sono manifestate forme respiratorie (in 4 gruppi) caratterizzate da scolo nasale e aerosacculiti. In un caso la metodica PCR ha evidenziato la presenza di MG a 20 giorni di età (il gruppo era negativo nei confronti di questo agente patogeno al primo giorno di vita), mentre negli altri gli esami sierologici condotti in periodi successivi hanno mostrato titoli anticorpali elevati nei confronti del virus TRT. I fenomeni respiratori sono rapidamente seguiti da episodi di colisettemia con conseguente aumento della mortalità. E' interessante notare la comparsa di frequenti casi di colisettemia anche in gruppi colpiti in precedenza da enterite virale. Da segnalare anche due casi di enterite necrotica (con isolamento di *Clostridium perfringens*) a 15 giorni di età e l'isolamento, alla medesima età, di un ceppo di *Campylobacter jejuni* in un gruppo che manifestava problemi enterici. E' stato inoltre osservato un grave caso di pseudomoniasi (a 25 giorni di età) provocato da una contaminazione verificatasi durante la somministrazione dei vaccini inattivati. Gli esami parassitologici hanno evidenziato la presenza di oocisti appartenenti al genere *Eimeria* in 5 gruppi a partire da 25 giorni di età. In due di essi

l'infezione è sfociata in una vera e propria patologia enterica complicata, a 35-36 giorni di età, da enterite necrotica con isolamento di *C.perfringens*.

RILIEVI DIAGNOSTICI IN ALTRI GRUPPI

Si segnalano, a 1 giorno di vita, alcuni isolamenti di salmonelle: *S.typhimurium*, *S.anatum* (gruppo E) e *S.heidelberg* (gruppo B). Rispetto al monitoraggio sopra descritto si osserva una prevalenza maggiore di forme respiratorie a partire dai 20-30 giorni di età con positività (spesso associate) al virus della TRT e a MG. In uno di questi gruppi sono state inoltre rilevati titoli anticorpali nei confronti di IBV. Da segnalare una grave forma respiratoria con isolamento di MG a 15 giorni di età. Infine è stato diagnosticato un grave caso di celostoma osservato a 7 giorni di vita.

RELAZIONE 5

DIAGNOSI ED EPIDEMIOLOGIA DELLE MALATTIE VIRALI ENTERICHE DEI TACCHINOTTI IN ITALIA

A. Lavazza¹, A. Moreno Martin¹, G. Tosi¹, L. Vinco², M. Cerioli¹
¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
²Veterinario Dipendente Azienda Integrata

Premessa

Le malattie enteriche nel loro complesso rappresentano una delle principali cause di danno economico nella produzione di tacchini commerciali.

Ciò è dovuto sia all'aumento della mortalità, durante il primo mese di vita, che in taluni casi può raggiungere livelli notevoli, sia alle lesioni più o meno reversibili all'intestino che induce un peggioramento dei principali parametri zootecnici, ovvero diminuzione dell'incremento ponderale giornaliero con conseguente maggior onere di gestione da parte dell'allevatore, e innalzamento dell'indice di conversione con sensibili ripercussioni sul costo di alimentazione e aumento del costo chilo-carne.

A questi danni bisogna poi aggiungere anche i maggiori oneri di gestione, derivanti da una serie di fattori: corretto mantenimento della lettiera, aumento della manodopera, uso di medicinali, maggiore riscaldamento dell'ambiente. Non bisogna inoltre dimenticare il danno derivante dalla ridotta uniformità del gruppo a livello di impianto di macellazione in sede di lavorazione e di commercializzazione della partita, con la presenza di elevate quantità di scarti.

Le enteriti virali: eziologia, epidemiologia, sintomatologia e lesioni

I virus enterici sono sicuramente gli agenti eziologici riscontrati più frequentemente in corso di episodi di enterite nei tacchinotti di età compresa tra 1 e 4 settimane (1,4,5).

Vari agenti virali sono stati finora identificati in tacchinotti con sintomatologia enterica, tra cui *rotavirus* (7,8), *astrovirus* (2,3,9,12), *enterovirus* (6,7), *parvovirus*, *adenovirus*, *coronavirus* (10,11), *reovirus*, *pseudopicornavirus*, *torovirus*, nonché i cosiddetti "*rod shaped virus-like particles* (RSVLP), la cui reale natura ed attitudine patogena non è ancora stata chiarita (18).

Tutti questi virus possono agire sia come agenti primari (nel qual caso possono essere isolate una o più specie virali contemporaneamente) sia in associazione con altri agenti, infettivi e non.

L'età dei soggetti colpiti è generalmente compresa tra la 1 e la 4 sett. (max incidenza tra 5 e 28 giorni) e la malattia ha un decorso di 10-14 giorni. Di conseguenza la maggior parte degli animali che contraggono una forma enterica, la superano entro la sesta settimana. Unica eccezione è rappresentata dall'enterite trasmissibile da coronavirus, che può interessare soggetti anche di maggiore età, seppure con quadri progressivamente meno gravi (14).

La sintomatologia è caratterizzata inizialmente da diarrea, pigolio, nervosismo, ingestione di lettiera, seguito da astenia, anoressia, depressione, disidratazione, ammassamento con mortalità per inedia e/o soffocamento (15).

All'esame autoptico nei tratti di intestino tenue, le cui pareti sono solitamente assottigliate e trasparenti si ritrova un contenuto liquido misto a gas ed in alcuni casi associato alla presenza di alimento indigerito. I ciechi sono dilatati e mostrano anch'essi assottigliamento delle pareti e contenuto schiumoso.

La morbilità è generalmente elevata mentre la mortalità può variare in dipendenza di vari fattori tra cui, in primis, il management aziendale. Negli USA in presenza di PEMS associata a coronavirus, reovirus e astrovirus sono state raggiunte delle mortalità del 50% e oltre.

Indipendentemente dal tasso di mortalità, comunque, il danno maggiore consegue alla morbilità, se si considera che generalmente il 5-20% dei soggetti di un gruppo colpito rimane sottopeso fino a fine ciclo (14).

Le enteriti virali: diagnostica di laboratorio

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 anche quando la malattia è sostenuta da virus non coltivabili, identificare infezioni virali multiple o virioni non replicabili (immunocomplessati). Ma soprattutto in medicina veterinaria rende 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'ISZLER 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.

Accanto all'indagine al ME in colorazione reattiva, che va comunque considerato il metodo di elezione per una diagnosi routinaria e completa, si possono applicare altri metodi di indagine virologica. I metodi di isolamento *in vitro*, tuttavia, oltre ai tempi prolungati ed ai costi rilevanti che comportano, forniscono raramente risultati apprezzabili, vista la frequenza di agenti non isolabili in vitro che causano infezioni gastroenteriche. Può essere utile l'utilizzo di test ELISA per la diagnosi di rotavirus, anche se la maggior parte di quelli oggi disponibili sono allestiti con antisieri che identificano i virus di gruppo A, mentre è noto che nel tacchino possono essere sono frequentemente identificati rotavirus appartenenti ad almeno 4 gruppi differenti: in questo caso risulta quindi più utile ricorrere alla tipizzazione del RNA mediante elettroforesi. Altri metodi diagnostici utilizzabili includono

l'immunofluorescenza su sezioni criostatiche, l'immunoperossidasi e le tecniche molecolari tipo RT-PCR, l'indagine istopatologica.

Indagini condotte presso il Laboratorio ME dell'IZSLER

Campionamento: Durante il periodo 1994-2003, 428 campioni intestinali e fecali sono stati conferiti al laboratorio di Microscopia elettronica dell'IZSLER di Brescia. Tali campioni sono stati prelevati da tacchini commerciali di scarto e/o morti nel corso di focolai di enterite. 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. Negli allevamenti nei quali si sono verificati i focolai erano situati principalmente in Nord Italia (Veneto, Emilia-Romagna e Lombardia) e in tutti veniva effettuato il tutto pieno tutto vuoto. Le lesioni anatomo-patologiche consistevano in: assottigliamento e pallore della parete intestinale con contenuto liquido, dilatazione dei ciechi con contenuto schiumoso, cloacite, "impastamento" e cannibalismo cloacale.

In aggiunta al solo rilievo dell'incidenza delle varie forme virali (periodo 1994-2001), nel corso degli ultimi due anni (2002-2003), grazie soprattutto all'implementazione del nuovo sistema informatico di registrazione dati dell'IZSLER, è stato possibile correlare la presenza di virus agli esiti delle altre indagini di laboratorio. In linea di massima nei soggetti con lesioni, in sede necroscopica si procedeva al prelievo dell'intestino tenue e dei ciechi, di fegato e milza, che venivano utilizzati, oltre che per l'indagine virologica anche per gli esami di routine batteriologico e parassitologico, eseguiti con tecniche standard, allo scopo di evidenziare i più comuni e principali agenti infettivi e infestivi di enterite (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *Clostridium sp.*, *Eimeria spp.*, *Trichomonas*, *Histomonas*, *Ascaridia dissimilis*, etc.).

Tabella1: 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		Rotavirus		Astrovirus		Enterovirus		Parvovirus		Adenovirus		RPSLV		Coronavirus		Ass.
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
1994	14	12	85,7	1	7,1	0	0,0	1	7,1	0	0,0	0	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	0	0,0	2
1996	7	1	14,3	0	0,0	3	42,9	3	42,9	0	0,0	0	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	0,0	0	0,0	2
1998	49	28	57,1	10	20,4	16	32,7	3	6,1	1	2,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9
1999	48	23	47,9	11	22,9	13	27,1	2	4,2	0	0,0	2	4,2	0	0,0	4	8,3	7
2000	41	19	46,3	14	34,1	10	24,4	0	0,0	4	9,8	1	2,4	2	4,9	1	2,4	9
2001	64	26	40,6	22	34,4	14	21,9	12	18,8	2	3,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	12
2002	77	46	59,7	11	14,3	17	22,1	0	0,0	6	7,8	2	2,6	1	1,3	1	1,3	7
2003*	91	41	45,1	30	33,0	23	25,3	4	4,4	4	4,4	2	2,2	0	0,0	2	2,2	14
Total	428	214	50,0	109	25,5	102	23,8	30	7,0	19	4,4	7	1,6	3	0,7	8	1,9	62

* fino al 31/7/2003

L'esame virologico è stato eseguito mediante tecniche di microscopia elettronica in colorazione negativa adottando la metodica comunemente in uso per la diagnosi di infezioni virali (13). I campioni sono stati sospesi in acqua distillata (10% v/v), poi immediatamente agitati mediante Vortex e congelati e scongelati rapidamente per due volte. Il surnatante è stato quindi centrifugato, una prima volta a 6000 rpm per 20 min. e poi a 10000 rpm per 20 min al fine di eliminare i detriti più grossolani. Il secondo surnatante (85µl) veniva quindi ultracentrifugato con Beckman Airfuge a 21 psi (103000 rpm) per 15 min in un rotore A100 portante sei provette da 175µl, in cui erano alloggiati speciali adapters, che permettono il pelletamento delle sospensioni virali direttamente su griglie in rame rivestite con Formvar e carbonate. Le griglie sono state colorate negativamente con una soluzione al 2% del sale sodico dell'acido fosfotungstico (NaPt), pH 6,8, ed esaminate con un TEM Philips CM10, operante a 80kV. L'identificazione delle particelle virali, osservate ad ingrandimenti compresi fra 15500 e 39000x, veniva eseguita sulla base delle caratteristiche morfologiche tipiche dei virioni. L'esame di immuno-elettron-microscopia (IEM) era eseguito su tutti i campioni al fine di concentrare e innalzare il titolo virale, inducendo l'aggregazione delle particelle virali. Il metodo consisteva nell'incubare i campioni diagnostici, ovvero il secondo surnatante di centrifugazione, 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, gentilmente inviatoci dal Prof Y.M. Saif (Ohio, USA).

I risultati dell'esame virologico sono quindi stati analizzati al fine di determinare: a) l'agente/i virale più frequentemente riscontrato nel nostro territorio; b) l'età più colpita; c) il fattore predisponente o aggravante più frequente; d) l'eventuale andamento stagionale della patologia; e) l'eventuale persistenza del virus in più cicli in uno stesso allevamento; f) l'andamento sanitario e rendimento zootecnico delle partite colpite.

Risultati

Tramite EM e IEM si è visto la presenza di particelle virali nel 50,0% dei campioni esaminati (Tabella 1); rotavirus è stato identificato nel 25,5%, astrovirus nel 23,8%, enterovirus-like nel 7,0%, parvovirus-like nel 4,4%.

Sporadicamente è stata riscontrata anche la presenza di, adenovirus e rod-shaped virus-like particules (RSVLP). I dati completi vengono riportati in tabella 1. Il range di positività andava da 14,3 e 85,7% ed anche negli ultimi anni, quando si è avuto un sensibile incremento di conferimenti, è stata riscontrata una positività virale sempre leggermente superiore al 40%.

Si è spesso osservata (62 casi) la contemporanea presenza nello stesso campione di due o anche tre diversi virus in associazione. L'associazione rotavirus più astrovirus era l'associazione riscontrata con maggior frequenza (45 casi), sottolineando il loro ruolo patogeno e la loro importanza quali agenti primari di enterite (Tabella 2).

Tabella 2: Infezioni multiple osservate alla ME

Table 2: Multiples infections observed at EM

Tipo di associazione	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Tot.
Rota + Astro				1	7	7	6	10	4	10	45
Rota + Astro + Entero										1	1
Rota + Enterolike		2		1	1		1	1			6
Rota + Parvolike							1		1	2	4
Astro + Parvolike								1	1		2
Enterolike + Parvolike					1					1	2
Adeno + Parvolike							1				1
Astro + Adeno									1		1
Totale	0	2	0	2	9	7	9	12	7	14	62

Altro riscontro degno di nota è la identificazione di coronavirus. Tuttavia, se già nel 1999 si erano identificate particelle morfologicamente riferibili a coronavirus in quattro distinti episodi di enterite, è solo a partire dal caso verificatosi nel 2000 (19) che, con la tecnica di immunoelettromicroscopia eseguita impiegando l'utilizzo di antisiero policlonale positivo nei riguardi del coronavirus del tacchino, si è potuto avere la identificazione certa dell'agente eziologico. Fatto questo che si è verificato in tre successivi episodi: 1 nel 2002 in un gruppo di 11 gg di età ed 2 nel 2003, rispettivamente in gruppi di 20 e 25 gg di età.

Da rilevare, infine, la mancata identificazione di reovirus, spesso peraltro indicati dagli Autori Americani come possibile concausa di quadri di PEMS.

Per quanto concerne i risultati dell'esame batteriologico e parassitologico si è riscontrata positività soprattutto per coccidi, *Salmonella* spp. e *E. coli*. Questi si sono riscontrati sia in assenza che in associazione a virus enterici (Tabella 3).

Tabella 3: Presenza di altri agenti patogeni in associazione o meno ad agenti virali

Table 3: Identification of other pathogens in association or nor with viral agents

VIRUS POS			Tot	VIRUS NEG			Tot
NEG			30	NEG			21
<i>E. coli</i>	setticemico		14	<i>E. coli</i>	setticemico		30
<i>E. coli</i> +	coccidi		3	<i>E. coli</i> +	coccidi		2
	<i>Staphylococcus</i> sp		4		<i>Salmonella</i> sp		5
	<i>Enterococcus</i> sp		1		<i>Campylobacter jejunum</i>		1
	<i>Candida</i> sp		1		<i>Proteus</i> sp.		2
	<i>Salmonella</i> sp		1		<i>Staphylococcus aureus</i>		1
<i>Clostridium</i> sp +	coccidi		2		<i>Streptococcus</i> sp.		1
	<i>Salmonella</i> sp.		1	<i>Clostridium</i> sp			4
<i>Salmonella</i> sp.			3	<i>Salmonella</i> sp			3
<i>Staphylococcus aureus</i>			2	<i>Streptococcus</i> sp			1
<i>Enterococcus faecalis</i>			1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>			1
Histomonas			1	Trichomonas+Protozoi			1
Ornithobacterium			1	Coccidi			6
n.e.			12	n.e.			9
totale			77	totale			88

Nel complesso la prevalenza di quadri riferibili ad enterite virale è risultata più elevata nei soggetti di età compresa fra 10 e 21 gg (Tabella 4) confermando quanto descritto da vari autori (1,4,14).

Tabella 4: Positività virali in rapporto alle classi di età (campioni con anamnesi nota 2002-2003)

Table 4: Distribution of viral positivity in classes of age (samples with anamnestic data 2002-2003)

2002-3	1-7 gg	8-14gg	15-21gg	22-28gg	>28 gg	Totale
Neg	19	9	11	6	1	46
Astro	4	5	2	1	0	12
Rota	6	2	3	1	0	12
Corona	0	1	0	1	0	2
Entero	0	1	0	0	0	1
Parvo	1	0	0	0	0	1
Astro + Rota	2	2	0	0	0	4
Atro + Rota + Entero	0	0	0	1	0	1
Totale pos.	13	11	5	4	0	33
Totale	32	20	16	10	1	79

Discussione

L'incidenza di queste forme è apparsa pressoché costante nel corso delle diverse stagioni dell'anno.

Non così i danni conseguenti che risultavano sensibilmente maggiori nel periodo invernale e a causa della tendenza dei soggetti ad ammassarsi in cerca di calore con conseguente aumento della mortalità per soffocamento. Per lo stesso motivo repentini sbalzi di temperatura verso il basso, unitamente ad un aumento di umidità della lettiera sono da ritenersi i fattori condizionanti principali che favoriscono l'insorgenza di quadri enterici o ne aumentano il danno economico elevato. A sua volta l'aumento di emissioni liquide crea all'allevatore seri problemi di gestione della lettiera.

Ad eccezione di qualche caso sporadico gli episodi di enterite non si sono ripetuti per più cicli nel medesimo allevamento, a testimonianza dell'efficacia della strategia del tutto-pieno/tutto vuoto.

Tale scelta manageriale potrebbe anche giustificare la scarsa prevalenza di sindromi multifattoriali sul tipo della PEMS descritta negli USA, la cui comparsa potrebbe essere favorita da elevati livelli di microbizzazione ambientale, quali si realizzano in caso di riutilizzo della medesima lettiera per più cicli.

Nei casi osservati, pur in presenza di quadri batterici secondari, la gravità degli episodi e l'impatto economico non ha mai raggiunto livelli estremi, anche per la qualità dell'intervento correttivo operato dagli allevatori e basato sostanzialmente su misure di profilassi diretta.

La tempestività dell'intervento sul microclima ed il miglior governo degli animali nelle fasi critiche ha spesso consentito di mantenere i tassi di mortalità e le perdite economiche entro valori accettabili.

Bibliografia

1. Reynolds D.L., Saif Y.M., Theil K.W. A Survey of Enteric Viruses of Turkey Poults. *Avian Dis.* 31:89-98, 1987.
2. Reynolds D.L., Saif Y.M. Astrovirus: a Cause of an Enteric Disease in Turkey Poults. *Avian Dis* 30:728-735, 1986.
3. Thouvenelle M.L., Haynes J.S., Reynolds D.L. Astrovirus Infection in Hatchling Turkeys: Histologic, Morphometric, and Ultrastructural Findings. *Avian Dis.* 39:328-336, 1995.
4. Reynolds D.L., Saif Y.M., Theil K.W. Enteric Viral Infections of Turkey Poults: Incidence of Infection. *Avian Dis.* 31:272-276, 1987.
5. Saif L.J., Saif Y.M., Theil K.W. Enteric Viruses in Diarrheic Turkey Poults. *Avian Dis.* 29: 798-811, 1985.
6. Hayhow C.S., Saif Y.M., Kerr K.M., Whitmoyer R.E. Further Observations on Enterovirus Infection in Specific-Pathogen-Free Turkey Poults. *Avian Dis.* 37: 124-134, 1993.
7. Hayhow C.S., Saif Y.M. Experimental Infection of Specific-Pathogen-Free Turkey Poults with Single and Combined Enterovirus and Group A Rotavirus. *Avian Dis.* 37: 546-557, 1993.
8. Yason C.V., Schat K.A. Pathogenesis of Rotavirus Infection in Turkey Poults. *Avian Pathology*, 15:421-435, 1986.
9. Schultz-Cherry S., King D.J., Koci M.D. Inactivation of an Astrovirus Associated with Poults Enteritis Mortality Syndrome. *Avian Dis.* 45: 76-82, 2001.
10. Ismail M.M., Cho K.O., Ward L.A., Saif L.J., Saif Y.M. Experimental Bovine Coronavirus in Turkey Poults and Young Chickens. *Avian Dis.* 45: 157-163, 2001.
11. Cavanagh D. The Role of Coronavirus in Enteric Diseases of Turkeys. *Proceedings of the 24th Technical Turkey Conference*, Vol 49: 31-34, 25-27 April 2001.
12. M.S. McNulty, W.L. Curran, J.B. McFerran. Detection of Astroviruses in Turkey Faeces by Direct Electron Microscopy. *The Veterinary Record*, 106: 561, 1980.
13. Misciattelli M.E., Guarda F., Valenza F., Belletti G.L., Sali G., Righi F., Peveri F., Biancardi G. Parvovirus associati a gastroenterite nei cani: identificazione al microscopio elettronico con applicazioni di immuno-elettromicroscopia, rilievi istopatologici, ematologici e clinici. *Ann. Fac. Med. vet. Torino* 26, 3-20, 1979.
14. Donald L. Reynolds. Enteric viruses In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Fourth Edition pp. 175-184, 1998.
15. Reynolds D.L. 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. 1997.
16. Nagaraya K V & Pomeroy B.S. (1997) Coronavirus 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
17. Cavanagh D., Mawdiit K., Sharma M., Drury S.E., Ainsworth H.L., Britton P., Gough R.E. Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology*, 30:355-368, 2001.
18. Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D. Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Veterinary Record*, 126: 581, 1990.
19. Moreno Martin A., Vinco L., Cordioli P., Lavazza A.. Diagnosis of turkey viral enteric diseases by electron microscopi and identification of coronavirus in a case of turkey enteritis. *Proceedings of the 4th International Symposium of Turkey Diseases*. Berlin 15-18/maggio 2002. (in stampa)

COMUNICAZIONE 1

VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA AVIARE: INFEZIONE SUBCLINICA NEL BROILER

R. Ceruti², L. Gavazzi², A. Volorio³, A. Zanella¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene Veterinaria e Salute Pubblica, Sez. Microbiologia e Immunologia, Università di Milano; ²Gruppo Amadori Cesena; ³Fatro Spa, Divisione Biologici, Bologna.

Parole chiave: virus anemia infettiva aviare (CAV), broiler, ELISA

Chicken anemia virus: subclinical infection in broiler

Key words; chicken anemia virus (CAV), broiler, ELISA

Summary: Results of a survey on frequency and economical effects of horizontal transmission of chicken anaemia virus infection in commercial broilers are reported. Serological tests at slaughter on 46 broiler flocks, using an ELISA kit showed a high prevalence of positive reaction (83%), of which 8 partially. No significant differences in major production parameters were found between CAV positive and negative flocks in field conditions.

Correspondence: Antonio Zanella via Gioberti 19, 25128 Brescia, Italy. fatromaclodio@libero.it

Introduzione

L'infezione da virus dell'anemia infettiva aviare (CAV) è diffusa nel pollo in tutto il mondo. L'agente patogeno è un piccolo DNA virus a singolo filamento, senza envelope, recentemente classificato come *Gyrovirus*, famiglia *Circoviridae*. Causa una malattia nei pulcini caratterizzata da grave anemia, deplezione linfoide (particolarmente atrofia del timo), emorragie diffuse ed elevata mortalità (5-30% e oltre). La malattia si manifesta nella progenie quando i riproduttori si infettano durante la deposizione, sia pure senza apparente effetto sulla deposizione, fertilità e schiusa. CAV è quindi trasmesso verticalmente per 4-6 settimane e la progenie manifesta la malattia nelle prime 2-3 settimane di vita. La crescita degli animali guariti è stentata e spesso aggravata da dermatite (blue wing) e da altre infezioni batteriche, dovute all'effetto immunodepressivo del virus (1, 2, 3 e 4).

I broilers possono infettarsi anche orizzontalmente, dopo la scomparsa degli anticorpi materni (3^a settimana). Ciò potrebbe risultare in una minore performance, dovuta ad una forma subclinica dell'infezione (7, 8), anche se tale condizione non è stata sempre confermata (3, 5 e 6). In alcune ricerche sierologiche anticorpi anti-CAV sono stati evidenziati alla macellazione in una variabile percentuale di allevamenti di broiler, talvolta oltre il 50% (3, 6, 7, 8). Anche a causa di questi controversi effetti economici della trasmissione orizzontale dell'infezione subclinica del broiler, abbiamo voluto investigare la situazione nel nostro paese.

Materiali e metodi

Numerosi gruppi di broiler maschi, provenienti da genitori della stessa razza, regolarmente vaccinati contro CAV nella fase di pollastra in una grande azienda integrata, sono stati controllati durante tutto il periodo produttivo. I broiler venivano regolarmente vaccinati contro ND, IB e IBD. Il mangime proveniva dallo stesso impianto. Da 10 soggetti di ciascun gruppo veniva prelevato il sangue al macello. Da 2 gruppi il sangue è stato prelevato ogni settimana al fine di controllare il tempo di scomparsa degli anticorpi materni e l'eventuale momento di comparsa di anticorpi attivi. Le performance dei vari gruppi venivano monitorate per i principali parametri produttivi, cioè peso, conversione mangime e mortalità. I campioni di sangue venivano esaminati per la presenza di anticorpi anti-CAV con la tecnica

ELISA, usando un kit della Idexx Laboratories Inc, West Brook, ME.

Risultati

N° 46 gruppi di broiler, per un totale di 2,5 milioni di capi, sono stati controllati dal giugno 2002 all'aprile 2003. Nessuna sintomatologia specifica è stata osservata durante le ispezioni settimanali di routine.

Di 46 gruppi esaminati al macello, 38 (83%) sono risultati positivi al CAV, 8 dei quali parzialmente ed 8 (17%) sono risultati negativi. Nessuna differenza sostanziale è stata rilevata tra le 3 categorie di gruppi nei parametri produttivi e nella mortalità. I risultati sono comunque riportati in tabella 1 e 2.

Discussione

La prevalenza dell'infezione da CAV nei gruppi di broiler della presente indagine, confrontata con i risultati sierologici riportati in altri paesi (7-9) è risultata considerevolmente più elevata: 83% contro un massimo del 50%. Si ritiene comunque opportuno allargare l'indagine ad altre aziende integrate per una più ampia conoscenza della diffusione.

I risultati economici riferiti hanno mostrato che l'infezione subclinica da CAV non sembra avere alcun sostanziale effetto negativo sulle performance del broiler. Le opinioni in proposito sono alquanto discordanti anche se la letteratura è piuttosto scarsa.

L'età alla quale si manifesta l'infezione potrebbe essere di una certa importanza: più presto avviene dopo la scomparsa degli anticorpi materni più i risultati economici potrebbero essere influenzati negativamente. Prove comparative, in condizioni sperimentali, con o senza infezione a diverse età a partire dalla 3^a settimana, escludendo l'interferenza di molti altri fattori, infettivi o meno, potrebbe permettere un giudizio più esatto, anche per quanto riguarda l'effetto immunodepressivo del CAV. D'altra parte è provato che l'infezione di pulcini con anticorpi materni nei primi giorni di vita non altera i valori di ematocrito e gli animali rimangono perfettamente sani (10).

Il possibile uso di un vaccino vivo molto attenuato, da somministrare verso la terza settimana, è stato dibattuto in alcuni convegni, con opinioni piuttosto discordanti; un tale vaccino dovrebbe, peraltro, essere molto attenuato.

In conclusione ulteriori ricerche sono ritenute necessarie, dal momento che pochi e conflittuali dati sono disponibili e che molti sono i fattori, come il management, la stagione, i ricoveri, la razza, l'alimentazione, etc., che possono influenzare le

performance del broiler e portare ad interpretazione errate.

Bibliografia

- Bülow V.V., R.Rudolph and B. Fuchs. Erhohte Pathogenicitat des Erregers der aviären infektiösen Anaemie by Huhnerkuken (CAA) bei simultaner Infektion mit dem virus der Marekschen Krankheit (MDV) Bursitisvirus (IBDV) oder Reticuloendotheliosis Virus (REV). J. Vet. Med. B 33: 93-116. 1986.
- Chettle N. J., R. Eddy, P. Y. Wyeth and S. A. Lister. An outbreak of disease due to chicken anemia agent in broiler chickens in England. Vet. Rec. 124: 211-215. 1989.
- De Hert P., G. van den Bosch, R. Ducatelle, E. Uytbroek and C. Schrier. Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broiler and broiler parents under nonvaccinated european circumstances. Avian. Dis. 45: 706-708. 2001
- Engstrom B. E., O. Fossum and M. Luthman. Blu wing disease of chickens: experimental infection with a Swedish isolates of chicken anemia agent and avian reovirus. Avian Pathol. 17: 33-50. 1988.
- Goodwin M. A., M. A. Smelzer, J. Brown, B. L. Murray and S. Mc Carter. Effect of so-called chicken anemia agent maternal antibody on chicks serologic conversion to viruses in the field. Avian Dis. 37: 542-545. 1993.
- Jørgensen P. H., L. Ohe, O. L. Nielsen and M. Bisgaard. Influence of subclinical virus infections and other features on broiler flock performance. Br. Poult. Sci. 36: 455-463. 1995.
- Mc Ilroy S. G., M. S. Mc Nulty, D. W. Bruce, J. A. Smith, E. A. Goodall and M. J. Alcon. Economic effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. Avian Dis. 36: 566-574. 1992.
- Mc Nulty M. S., S. G. Mc Ilroy, D. W. Bruce and D. Todd. Economic effect of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chicken. Avian Dis. 35: 263-268. 1991.
- Yuasa N. T., T. Yamiguchi, T. Noguchi and I. Yoshida. Effect of infectious bursal disease virus infection on incidence of anemia by chicken anemia agent. Avian Dis. 24: 202-209. 1980.
- Zanella A., P. Dallara, A. Lavazza, R. Marchi, A. Moreno Martin, T. Rampin and G. Tosi. Interaction between Marek's disease and chicken infectious anaemia viruses. 6th Int. Symp. on Marek's Disease, Montreal August 20-23, pp. 11-19 2000.

Tabella 1: Parametri produttivi in broiler a 58 giorni d'età, correlate alla condizione sierologica verso il CAV.
Table 1: Performance parameters in broilers at 58 days of age correlated with serological condition to CAV.

VALORI	POSITIVI				PARZIALMENTE POSITIVI				NEGATIVI			
	no gruppi	peso g.	I.C.	Mort. %	no gruppi	peso g.	I.C.	Mort. %	no gruppi	peso g.	I.C.	Mort. %
Medio		3493	2.060	5.06		3552	1.980	5.16		3529	2.014	5.04
Minimo	30	3323	1.940	2.38	8	3375	1.930	3.36	8	3378	1.980	3.77
Massimo		3650	2.140	7.40		3623	2.091	6.44		3660	2.088	6.13

Tabella 2: Parametri produttivi in 2 gruppi di broiler con reazione sierologica positive ad età diverse.
Table 2: performance parameters in two flocks of broilers showing positive serological reaction at different age.

Gruppo	Età a macellazione (giorni)	Età a positività (giorni)	Peso g.	I.C	Mortalità %
1	58	53	3390	2.119	6.5
2	58	38	3385	2.103	5.9

COMUNICAZIONE 2

OSSERVAZIONI SU CASI DI NEUROPATIA PERIFERICA IN POLLI DI LINEA LEGGERA

T. Rampin, G. Manarolla, G. Sironi, C. Guidarini, C. Motta

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

Parole chiave: pollo, neuropatia periferica, Malattia di Marek

Field cases of peripheral neuropathy in layer pullets

Key words: chicken, peripheral neuropathy, Marek Disease

Summary: 18 cases of peripheral neuropathy affecting layer pullets in Italy are reported. Histological lesions are described. Clinical, necropsical and histological observations on a PN affected capon treated with desametazone are reported. Common features with neural lesions in Marek Disease are discussed.

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

Introduzione

Presso la nostra Sezione si sono osservati recentemente in polli di linea leggera diversi casi di neuropatia periferica (PN), forma morbosa su base immunomediata, con aspetti sovrapponibili a quadri ritenuti tipici della malattia di Marek (MD), di rare forme idiopatiche del pollo e di forme sperimentali riprodotte mediante inoculazione di mielina o componenti mieliniche. Anche in medicina umana sono note patologie simili alla PN dal punto di vista clinico e anatomopatologico, quali la sindrome di Guillain-Barré (GBS). Scarse sono a tutt'oggi le segnalazioni di casi di campo di PN (1 e 3) anche se la patogenesi ed i meccanismi immunomediati che ne stanno alla base sono stati in parte recentemente chiariti sulla base di dati sperimentali (1). Ci è perciò sembrato utile segnalare con questo lavoro i risultati delle nostre osservazioni.

Materiali e metodi

Dal novembre 2000 al marzo 2002 sono giunti presso la nostra Sezione campioni in formalina di nervi periferici ed eventualmente di visceri provenienti da 15 gruppi di pollastre commerciali con sintomatologia riferibile a PN. Da altri 3 gruppi venivano recapitate pollastre che, dopo esame clinico, venivano sacrificate e sottoposte a indagini necroscopiche ed istologiche. Dai campioni fissati in formalina al 10%, dopo inclusione in paraffina, si ottenevano sezioni di 4 µm poi colorate con ematossilina-eosina (HE). Su alcune sezioni di nervi veniva eseguita la colorazione di Tolivia per la mielina (13). Un controsesso di linea leggera è stato inoltre tenuto in osservazione presso il nostro stabulario. Il soggetto faceva parte di un gruppo di 1500 animali capponati a 4 settimane d'età ed era l'unico a mostrare sintomatologia nervosa. Il capone veniva trattato per via parenterale con desametazone alla dose di 3 mg/kg con somministrazioni giornaliere per la prima settimana, a giorni alterni per la seconda e terza settimana e bisettimanali per la quarta e la quinta. Dopo 3 mesi è stato sacrificato, sottoposto a necroscopia ed al prelievo di vari tratti di nervi e di campioni di visceri. Il materiale è stato fissato in formalina al 10% e trattato come più sopra descritto.

Risultati

Dei 3 gruppi di pollastre esaminate, i soggetti di 2 presentavano una sintomatologia nervosa più o meno grave: da una generica difficoltà di deambulazione al ben noto atteggiamento di spaccata. Ispessimenti irregolari si osservavano a livello di rami del plesso

lombosacrale e brachiale, del nervo ischiatico e dei nervi intercostali di questi soggetti. Nessuna alterazione viscerale era presente, fatta eccezione per un'atrofia degli organi linfatici primari (borsa di Fabrizio e timo). Dal terzo gruppo di pollastre, in cui si erano notati in allevamento casi di "spaccata", venivano inviati soggetti che non mostravano sintomi né alterazioni dei nervi macroscopicamente apprezzabili. Anche in questo caso si notava atrofia degli organi linfatici e lieve ipoplasia splenica. In tutti i 18 gruppi di pollastre l'esame istologico dei nervi periferici campionati rivelava quadri di neurite cronica di variabile gravità, caratterizzata da un'infiltrazione di linfociti e plasmacellule o diffusa nella compagine del nervo oppure strutturata in aggregati d'aspetto similfollicolare localizzati tra le fibre nervose, spesso in vicinanza di vasi. In corrispondenza delle aree interessate dalla flogosi era apprezzabile demielinizzazione multifocale delle fibre nervose, vacuolizzazione assonale diffusa, edema ed iperemia di grado da lieve a moderato. Quando compresi nella sezione, anche i gangli potevano presentare analoghi aspetti d'infiltrazione linfoplasmacellulare. Nelle sezioni di nervo sottoposte alla colorazione di Tolivia si confermava la presenza di aree di demielinizzazione in coincidenza con l'infiltrazione linfoplasmacellulare. Notevolmente variabile era la gravità delle lesioni tra i soggetti di uno stesso gruppo e talvolta persino lungo uno stesso tronco nervoso. L'esame istologico di altri visceri non evidenziava alterazioni riferibili a forme morbose specifiche, si notavano comunque lievi aspetti di deplezione linfocitaria in qualche sezione di milza, timo e borsa di Fabrizio. Per quanto riguarda i dati di allevamento, 16 delle 18 partite di pollastre che compongono la nostra casistica, non hanno mostrato ulteriori problemi sanitari, neppure dopo l'inizio della deposizione, che è stata regolare per numero e qualità delle uova. In particolare non si sono verificati casi di M. Dei rimanenti 2 gruppi non si sono avute più notizie. All'arrivo il capone tenuto in osservazione si presentava immobilizzato in atteggiamento di "spaccata" ed era in pessimo stato di nutrizione. E' stato dunque necessario nella prima decade aiutarlo a bere più volte al giorno ed assicurarsi che fosse sempre accanto alla mangiatoia. Al 10° giorno di trattamento cortisonico la rigidità delle zampe era diminuita ed il soggetto riusciva a raggiungere autonomamente l'abbeveratoio. Il miglioramento è stato lento e costante: 4 settimane dopo il suo arrivo la

deambulazione risultava abbastanza spedita e nella 5° settimana normale, tanto che il trattamento cortisonico veniva sospeso. Nelle 8 settimane successive la sua situazione clinica è rimasta costante senza la minima ricomparsa di sintomi nervosi. Al momento del sacrificio il suo stato di nutrizione appariva notevolmente migliorato. In corso di necropsia si evidenziava soltanto una soffiatura emorragica al di sotto del perinervio del nervo ischiatico sinistro ed una completa atrofia della borsa di Fabrizio. All'esame istologico dei tronchi nervosi si notavano modici infiltrati in alcuni tratti del plesso lombosacrale e del nervo ischiatico di sinistra ed infiltrazione diffusa di media entità nel plesso brachiale sinistro.

Discussione

Nel giro di due anni sono stati diagnosticati 18 casi di polineurite linfoplasmacellulare accompagnata da demielinizzazione in pollastre commerciali di 3 linee genetiche diverse ed è stato seguito un caso in un controsesso, proveniente da un gruppo di capponi. Questa forma morbosa presenta caratteri sovrapponibili a quella denominata PN di cui vengono segnalati 6 casi di campo (1). Nello stesso lavoro si riferisce la riproduzione sperimentale di questa entità morbosa di cui viene formulata anche una ipotesi patogenetica. Inoltre si definiscono i caratteri clinici ed epidemiologici propri della PN: esclusivo interessamento di linee leggere, età di insorgenza (come minimo 6 settimane), incidenza tra 0 e 3%, totale assenza di lesioni tumorali viscerali, in base ai quali è possibile differenziarla dalla MD. Tutti i casi da noi esaminati soddisfano queste condizioni, anzi la precocità di insorgenza è risultata in qualche caso anche maggiore (33 giorni). Non di tutti i casi è stata stimata l'incidenza, comunque quando questi dati sono stati forniti erano compresi tra lo 0.5% e il 2.6%. Si sottolinea che la MD viscerale non è mai stata segnalata per tutto il resto del ciclo produttivo nei gruppi di provenienza delle pollastre con PN, se si fa eccezione di 2 partite di cui non si sono più avute notizie. Anche gli aspetti di atrofia degli organi linfatici già segnalati in letteratura (1) erano presenti negli animali sottoposti a necropsia. Chi ha seguito la maggior parte dei nostri casi di PN in campo ha avuto l'impressione che la comparsa della PN fosse maggiore nel periodo estivo, quindi nelle partite di pollastre schiuse in primavera. Fatto questo che non è stato segnalato prima d'ora e che risulta di difficile spiegazione. Nei casi in cui sono stati osservati animali in vita e si sono rilevate le lesioni macroscopiche, gli aspetti clinici e anatomopatologici riscontrati coincidevano con quelli della forma neurale della MD. Stessa identità di lesioni è stata riscontrata in tutti i casi a livello istologico, e più precisamente i quadri osservati coincidono con le lesioni neurali di tipo B della MD (9). È opportuno notare che, ad eccezione delle sole lesioni neurali di tipo A, tutte le altre lesioni nervose osservate in corso di MD mostrano una forte somiglianza con quelle che caratterizzano forme allergiche e autoimmuni, fenomeno notato già negli anni '60. Queste somiglianze si riscontrano, infatti, tra la cosiddetta "paralisi transitoria" (TP) e forme di encefalomielite allergica (10 e 11 citati da 8). Inoltre la TP come la PN è influenzata dal Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC), infatti è più frequente in polli con aplotipo B*6 che in polli B*13 (6 e 12 citati da 1).

Anche le lesioni neurali di tipo B riscontrate in caso di MD sono sovrapponibili a quelle che si hanno in forme infiammatorie su base immunomediata osservate in particolari linee di polli come polineurite idiopatica (2), segnalate in polli di partite commerciali (4 citato da 1), o provocate sperimentalmente sensibilizzando polli con inoculazioni di materiale ottenuto da nervi eterologhi od omologhi (8). L'identità degli aspetti morfologici tra le forme immunomEDIATE e le forme di TP e di lesioni neurali di tipo B riscontrate nella MD sono tali da giustificare l'ipotesi che anche nell'ambito della MD si metta in moto un meccanismo di tipo autoimmune (5) e che queste forme di MD possano fungere da modello animale di malattie immunomEDIATE dell'uomo come ad esempio la GBS (7). La PN viene quindi spiegata come una patologia immunomediata che interessa i nervi per una sensibilizzazione nei confronti della mielina o di un suo componente (1). In questo ambito è comprensibile che un trattamento con desametasone, come quello effettuato sul capponi che mostrava sintomatologia nervosa, abbia avuto un effetto terapeutico positivo, anche se la remissione della sintomatologia nervosa non era accompagnata dalla totale scomparsa delle lesioni neurali, come dimostrato dall'esame istologico. Ulteriori indagini su animali colpiti da PN non hanno potuto essere condotte perché il riscontro di PN nei gruppi commerciali è attualmente pressoché scomparso. Il numero relativamente elevato di casi da noi osservati in poco tempo lascia supporre che, a dispetto delle poche segnalazioni esistenti, la PN possa essere, o essere stata, un fenomeno piuttosto diffuso nell'allevamento intensivo della pollastra commerciale. Per quanto caratterizzata da un ridotto impatto economico, gli aspetti di grande interesse che riveste in patologia comparata e le somiglianze patogenetiche che sembra avere con la MD mantengono viva l'attenzione su questa forma morbosa.

Bibliografia

1. Bacon L.D., Witter R.L., Silva R.F., 2001, Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens, *Avian Pathol.*, 30, 487-499.
2. Biggs P.M., Shilleto R.F.W., Lawn A.M., Cooper D.M., 1982, Idiopathic polyneuritis in SPF chickens, *Avian Pathol.*, 11, 163-178.
3. Davidson I., Weisman Y., Perl S., Malkinson M., 1998, Differential diagnosis of two paralytic conditions affecting young chickens with emphasis on PCR findings, *Avian Pathol.*, 27, 417-419.
4. Julian R.J., 1992, Peripheral neuropathy causing "range paralysis" in leghorn pullets. Citato da 1.
5. Lampert P.W., 1978, Autoimmune and Virus-Induced Demyelinating Diseases, *Am J Pathol.*, 91, 175-208.
6. Parker M.A. e Schierman L.W., 1986, Evidence for MHC gene control of lesion severity in experimental allergic encephalomyelitis of chickens. Citato da 1.
7. Pepose J.S., Stevens J.G., Cook M.L., Lampert P.W., 1981, Marek's Disease as a Model for the Landry-Guillain-Barré Syndrome, *Am. J. Pathol.*, 103, 309-320.
8. Petek M. e Quaglio G. L., 1967, Experimental Allergic Neuritis in the Chicken, *Path vet.*, 4, 464-476.
9. Riddel C., *Avian Histopathology*, Published by American Association of Avian Pathologists, 1987, Allen Press Inc., Lawrence, Kansas.
10. Siller W.G., 1960, Experimental allergic encephalomyelitis in fowl. Citato da 8.
11. Siller W.G. e Wight P.A.L., 1962, Further studies of experimental allergic encephalomyelitis in fowl. The influence of age on the histological lesions. Citato da 8.
12. Schierman L.W. e Fletcher O.J., 1980, Genetic control of Marek's disease virus-induced transient paralysis. association with the major histocompatibility complex. Citato da 1.
13. Tolivia J., Tolivia D. e Navarro A., 1988, New Technique for Differential Staining of Myelinated Fibres and Nerve Cells on Paraffin Sections, *The anatomical record*, 222, 437-440.

COMUNICAZIONE 3

PROVA DI EFFICACIA DI UN ADDITIVO DI NUOVA CONCEZIONE PER LETTIERE NEL CONTROLLO DELL'AMMONIACA NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI DI POLLI DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI

G. Tacconi, P. Casagrande Proietti, R. Arcaro¹, R. Galli²

Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Igiene e Patologia, Università degli studi di Perugia;¹Laurea in SPA; Professore incaricato di Patologia aviare, Università degli Studi di Camerino

Parole chiave: additivo, ammoniaca, ambiente, pollo da carne

Evaluation of a litter additive efficacy in ammonia level control in broiler houses: preliminary results

Key words: litter additive, ammonia, environment, broiler

Summary: The objective of the present study was to evaluate the ammonia levels in broiler houses with litter treated with SOP-C POULTRY. The results showed different ammonia mean levels between the houses with treated litter and the control when submitted to the t-test.

Correspondence: Giuseppina Tacconi - Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Perugia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo, 4 06126, Perugia. Email gtacconi@hotmail.com

Introduzione

La intensificazione delle produzioni avicole, grazie alla ingegneria zootecnica ed impiantistica, ha usufruito di tutti gli strumenti indispensabili per la realizzazione di allevamenti di grandi dimensioni e all'avanguardia nella tecnologia. Tuttavia nella pratica di allevamento spesso si verifica una esasperazione del microambiente dovuta ad una riduzione della qualità dell'aria per la elevata concentrazione di gas e di microrganismi (2, 6). Si determinano così situazioni di rischio nel ricovero, per gli animali e per l'uomo esposti ai contaminanti (10), e nell'ambiente esterno, per le conseguenti emissioni dei gas (2; 9).

Tra questi, in particolare, l'ammoniaca, che naturalmente si forma all'interno dei ricoveri zootecnici, è considerato il gas maggiormente presente e difficile da tenere sotto controllo.

L'impiego di differenti metodi per ridurre la produzione di ammoniaca negli allevamenti avicoli e più in particolare di additivi per il trattamento della lettiera come il fosfato di calcio monobasico (7), l'acido fosforico (7 3), l'acido propionico (5), il solfato ferroso (1; 3), che agiscono riducendo il pH della lettiera, con la conseguente riduzione delle attività microbica ed enzimatica, sono già stati considerati da tempo.

La recente immissione nel commercio di un prodotto di nuova concezione in grado di migliorare le condizioni igieniche della lettiera e la mancanza di una documentazione bibliografica sulla sua efficacia hanno fornito l'argomento di studio della presente nota, che si propone pertanto di riferire dati preliminari sull'efficacia del trattamento della lettiera avicola con questo prodotto nel ridurre la concentrazione di ammoniaca nell'ambiente di allevamento.

Materiali e metodi

La sperimentazione iniziata nel Febbraio 2002, è stata effettuata presso una Azienda Agricola umbra, dove si allevano linee ibride specializzate nella produzione di polli da carne.

Il programma di allevamento prevede l'attuazione di 4 cicli ogni anno, secondo il sistema "tutto-pieno/tutto-vuoto" ed un vuoto sanitario di 7-10 giorni. Il sistema di allevamento praticato è quello a terra su lettiera, con una densità di 16 polli/m², per un totale di 47.000 polli per ciclo. La sperimentazione ha riguardato due capannoni, C₂ (con lettiera trattata) e C₃ (con lettiera

non trattata, come controllo). I capannoni, a tunnel e con finestre a vasistas, sono dotati di un sistema di ventilazione forzata e di un sistema rinfrescante del tipo "Pad Cooling".

Trattamento della lettiera. È stato effettuato cospargendo la lettiera di paglia trinciata (di 5-7 cm di spessore), con SOP[®] C POULTRY il giorno precedente l'arrivo dei pulcini ed è stato ripetuto successivamente, ogni due settimane; nel primo mese è stata impiegata la dose di 2 grammi di prodotto per m² mentre successivamente è stata ridotta a 1 grammo di prodotto per m².

Per facilitare lo spandimento omogeneo su tutta la superficie della lettiera, il prodotto è stato mescolato con carbonato di calcio nella quantità di 1 grammo di prodotto per ogni 25 grammi di carbonato di calcio, 24 ore prima della sua aspersione sulla lettiera.

SOP[®] C POULTRY è costituito da solfato di calcio (gesso) ed oli Essenziali (citronella e lavanda), utilizzati in modo non tradizionale ma come sostanze portanti. Con il metodo SIRIO OPERATING PROCESS[®], tali componenti vengono attivati mediante modulazione energetica ed arricchiti in ossigeno ed altre sostanze selezionate.

Rilievi dell'ammoniaca. Il capannone è stato virtualmente suddiviso in due parti e su ciascuna di queste due sono stati individuati 3 punti equidistanti (a destra, al centro e a sinistra) sulla superficie della lettiera. In questi punti, a terra e ad 1 m da questa, sono stati effettuati i rilievi di ammoniaca mediante Drager (Safety, Inc.-Pittsburgh, PA – USA).

Per ogni ciclo di allevamento sono stati effettuati due rilievi, rispettivamente entro i primi 7 giorni ed a fine ciclo.

Valutazione dei risultati. I valori medi di ammoniaca determinati nei due capannoni (trattato con SOP-C POULTRY e controllo) sono stati confrontati applicando la regola del "t di Student".

Risultati

Sono stati controllati in tutto n.6 cicli di allevamento. I dati relativi ai valori medi per punto di ammoniaca sono stati riportati nella Tabella 1, dal cui esame si evidenzia che: 1) i valori di ammoniaca riscontrati nel capannone trattato, sia a livello della lettiera che ad 1 m da questa, sono sempre più bassi rispetto a quelli del capannone controllo; 2) sottoponendo a confronto i

valori medi di entrambi i capannoni risulta una differenza altamente significativa ($P = 0,00003735$); 3) esaminando più in particolare i valori riscontrati nei primi giorni del ciclo tali differenze tra i valori dei due capannoni sono più attenuate entro la prima settimana di età, mentre diventano più evidenti verso la fine del ciclo. Un comportamento simile si osserva anche tra i primi due cicli e quelli successivi.

Discussione

I risultati ottenuti nel corso della presente sperimentazione forniscono dati interessanti e interessanti ad alcune considerazioni.

In primo luogo è da sottolineare che la differenza tra la media dei valori di ammoniaca riscontrati nel capannone trattato e quella relativa ai valori riscontrati nel capannone di controllo, è risultata altamente significativa. Tale valore assume un maggiore significato se si considera la posizione privilegiata del capannone di controllo, rispetto a quello trattato, perché ubicato esternamente e perciò più esposto ai venti. Più in particolare tale differenza, che è stata riscontrata nel corso di ciascun ciclo esaminato, è aumentata progressivamente sia nel corso del ciclo, sia tra un ciclo e il successivo. E' da precisare tuttavia che, malgrado la densità di volatili allevati sia superiore alla norma, nel capannone non trattato il livello medio di ammoniaca ha raggiunto valori elevati (40 e 41 ppm), anche se non sono paragonabili a quelli talvolta segnalati in bibliografia (190 e 337 ppm) (6). Si può ritenere che complessivamente l'impiego di SOP[®] C POULTRY abbia svolto una ottima azione di controllo dell'ammoniaca nel capannone trattato rispetto al controllo, e verosimilmente che tale azione si potenzia nel tempo. In un recentissimo lavoro Malone (4) elenca, in base al tipo di attività svolta dai prodotti di possibile impiego per tale scopo, 4 tipi di trattamento della lettiera con le rispettive caratteristiche, e nel sottolineare come la scelta del trattamento della lettiera, che meglio si accompagna ad ogni tipo di allevamento, sia abbastanza complessa, sottolinea l'importanza di adottare un

programma che preveda l'uso di un additivo per la lettiera coniugato con l'aspetto gestionale.

In accordo con l'Autore (4) si può dunque ritenere che tale additivo abbinato ad un sistema di ventilazione razionale possa mantenere a livelli bassi l'ammoniaca. Tale additivo può dunque, a pieno titolo, essere considerato tra le "migliori tecniche disponibili" previste dalla Direttiva 96/61 CEE.

Tali dati essendo al momento gli unici disponibili non solo non possono essere sottoposti ad alcun confronto ed anche se sono da considerare in linea con i dati forniti dalla Ditta produttrice ottenuti da ricerche effettuate presso laboratori privati, necessariamente richiedono ulteriori conferme in campo.

Bibliografia

- Huff W.E., Malone G.W., and Chaloupka G.W. (1984). Effect of litter treatment on broiler performance and certain litter quality parameters. *Poultry Sci.*,63:2167-2171.
- Kristensen H.H., and Whates C.M. (2000). Ammonia and poultry welfare. *World's Poultry Science Journal*,56,235-245.
- Malone B. (1987). Chemical bitter treatments to control ammonia. *Proceedings of the 22nd Meeting on Poultry Health Condemnsions, Ocean City,MD.*
- Malone B. (2003). Il trattamento delle lettiera avicole: come creare un giusto equilibrio tra produzione e management. *Zootecnica International*,4,32-35.
- Parkhurst C. R., Hamilton P.B. and Baughman G.R. (1974). The use of volatile fatty acids for the control of microorganisms in pine sawdust litter. *Poultry Sci.*,53:801-806.
- Quaglio G., Franchini F., Quaglio F. (1988). Ambiente e produzioni zootecniche. Le tecnopatie, malattie polifattoriali condizionate nell'avicoltura intensiva. *Rivista di Avicoltura*,2:19-28.
- Reece F.N., Bates B.J., and Lott B.D. (1979). Ammonia Control in Broiler Houses. *Poultry Science*,58:754-755.
- Sainsbury D. (1992). *Poultry Health and Management Chickens, Turkeys, Ducks, Geese, Quail*, 3rd ed., Blackwell Scientific Ltd, Oxford, UK.
- Valli L. (2001). Le emissioni di odori dagli allevamenti zootecnici. *L'Informatore Agrario*,46:35-39.
- Whyte R.T. (1993). Aerial pollutants and the health of poultry farmers. *World's Poultry Science Journal*,49,139-156.

Tabella 1. Prova di efficacia di SOP[®] C POULTRY: valori medi (per punto) di NH₃ riscontrati nei capannoni trattati e controllo.

Table 1. Efficacy trial of SOP[®] C POULTRY: mean of NH₃ values recorded in houses with treated litter and control.

Cicli	Età	CAPANNONE TRATTATO CON SOP C POULTRY						CAPANNONE CONTROLLO						
		Valore a terra (ppm)		Valore ad 1 metro (ppm)		Valore medio (ppm)		Valore a terra (ppm)		Valore ad 1 metro (ppm)		Valore medio (ppm)		
		P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	
1° CICLO	Pulcini	6	6	6	6	6	6	6	6	6	8	8	6.5	6.5
	Adulti	5	5	6	6	5.5	5.5	14	14	15	15	14.5	14.5	
2° CICLO	Pulcini	5	5	6	6	5.5	5.5	14	14	12	12	13	13	
	Adulti	6	6	12	12	9	9	31	31	26	26	28.5	28.5	
3° CICLO	Pulcini	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5	5	5	
	Adulti	9	15	8	11	8.5	13	41	31	28	26	34.5	28.5	
4° CICLO	Pulcini	7	0	0	-2	3.5	-1	0	10	0	9	0	9.5	
	Adulti	-2	0	0	0	-1	0	15	15	9	9	12	12	
5° CICLO	Pulcini	-3	-3	-1	-3	-2	-2	5	11	5	5	5	8	
	Adulti	15	10	11	6	13	8	40	31	38	24	39	27.5	
6° CICLO	Pulcini	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Adulti	11	8	3	3	6.5	5.5	17	35	11	21	14	28	

COMUNICAZIONE 4

INDIVIDUAZIONE DI MARKER GENETICI DELLA RESISTENZA A PENICILLINE ED AMINOGLICOSIDI IN CEPPI DI *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SIEROTIPO TYPHIMURIUM

F. Pasquali, G. Manfreda

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna

Parole chiave: penicilline, spectinomycin-streptomycin, fagotipo, origine, *Salmonella* Typhimurium

Detection of penicillin and aminoglycoside resistance genes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types and origins

Key words: penicillins, spectinomycin-streptomycin, phage type, source, *Salmonella* Typhimurium

Summary: In the present study 32 multiresistant *Salm.* Typhimurium strains of different phage types and collected from human and poultry, were investigated in order to evaluate the presence and localisation within integrons, of beta lactam resistance genes, *psel* and *tem 1-2*, and spectinomycin-streptomycin resistance gene, *ant(3'')-Ia*. 16 and 27 strains of different phage types, exhibited respectively *psel* and *ant(3'')-Ia* genes. Among those strains 14 and 26 respectively exhibited these genes within integrons of 1008, 1133, 1450 and 2100 bp approximately. The first two integrons were observed not only in DT104 phage type, as previously described, but also in other phage types (DT12, NT, U302). In particular RDNC strains, all of human origin, exhibited two different integrons of approximately 1450 and 2100 bp containing only *ant(3'')-Ia* gene.

Correspondence: Gerardo Manfreda, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via S. Giacomo 9, 40126 Bologna, Italy. Email: manfreda@alma.unibo.it

Introduzione

La comparsa di ceppi di *Salmonella* (*Salm.*) Typhimurium multiresistenti è un problema sanitario mondiale (6). L'acquisizione di tale carattere è spesso dovuto alla presenza di determinanti dell'antibiotico resistenza in elementi genetici mobili (es. gene cassettes). Queste strutture, mediante plasmidi e trasposoni, possono passare da un batterio ad un altro ed integrarsi a livello cromosomico in strutture genetiche dette integroni che, grazie alla presenza di un promotore, garantiscono un'espressione costante di tali geni (3). In particolare in *Salm.* Typhimurium DT104, sono stati individuati, in integroni di classe I, i geni *psel*, e *ant(3'')-Ia*, che codificano per una beta lattamasi e una adenililtransferasi, in grado di inattivare rispettivamente beta lattami (es. ampicillina) e spectinomycin-streptomycin (2,5).

Scopo del presente studio è stato quello di verificare la presenza dei suddetti geni e la loro localizzazione all'interno di integroni, in ceppi di *Salm.* Typhimurium multiresistenti, isolati in Italia da diverse fonti ed appartenenti a diversi fagotipi.

Materiali e metodi

Isolati testati

Gli isolati analizzati includono 32 ceppi di *Salm.* Typhimurium, di cui 9 di origine avicola e 23 di origine umana, appartenenti a 8 diversi fagotipi e risultati resistenti, secondo la metodica di Kirby-Bauer, ad ampicillina e spectinomycin. Una colonia pura per ciascun isolato, ottenuta da piastre LB agar, è stata trasferita in 5 ml di brodo LB e incubata overnight a 37°C prima dell'estrazione del DNA genomico.

Protocolli PCR

L'individuazione dei geni *psel*, *ant(3'')-Ia* e *intI* è avvenuta utilizzando la metodica riportata da Sanvang et al.(5). I ceppi risultati negativi per *psel* sono stati testati per la presenza dei geni *tem1-2*, codificanti per beta lattamasi, secondo il protocollo di Llanes et al.(4). Al fine di valutare l'eventuale localizzazione dei geni *tem1-2*, *psel* e *ant(3'')-Ia* all'interno di integroni, i ceppi positivi per i rispettivi geni sono stati testati usando combinazioni di primers forward dell'integrone e reverse di ogni gene di antibiotico resistenza secondo il protocollo di Sanvang et al.(5).

Il protocollo PCR per la combinazione *int-tem* è stato ottimizzato utilizzando 0.5 µM del primer forward di *intI*, 0.3 µM del primer reverse di *tem1-2* e 30 cicli ognuno dei quali caratterizzato da 1 min a 92°C, 2 min a 54°C e 3 min a 72°C.

Risultati

In Tabella 1 sono riportati i risultati relativi ai geni *tem1-2*, *psel* e *ant(3'')-Ia* e la loro localizzazione in integroni. 16 isolati hanno presentato il gene *psel*, e di questi, 14 sono risultati positivi per l'associazione *int-psel*. 4 ceppi di origine umana, appartenenti ai fagotipi DT104, DT179, DT194 e DT208, sono risultati positivi ai geni *tem1-2* senza che questi fossero localizzati all'interno di un integrone. I rimanenti 12 ceppi, pur essendo fenotipicamente resistenti, non hanno presentato positività per i marker genetici da noi selezionati e sono risultati appartenere tutti al fagotipo RDNC, ad eccezione del ceppo 248 con fagotipo DT208, ed isolati da fonte umana.

Inoltre 27 ceppi sono risultati positivi per il gene *ant(3'')-Ia* il quale, ad eccezione del ceppo 69 di origine avicola, è risultato localizzato all'interno di un integrone. 5 ceppi, tutti isolati da fonte umana ed appartenenti a fagotipi diversi, pur essendo fenotipicamente resistenti, sono risultati negativi per il gene *ant(3'')-Ia*.

I risultati relativi all'individuazione degli integroni hanno mostrato la presenza di 4 diversi tipi di integroni rispettivamente di circa 1008, 1133, 1450, 2100 bp. In particolare i primi due integroni erano presenti su ceppi isolati sia da fonte umana che da fonte avicola ed appartenenti ai fagotipi DT104, DT12, NT e U302 mentre gli altri due integroni sono stati individuati esclusivamente in ceppi di origine umana tutti appartenenti al fagotipo RDNC. Gli isolati di origine umana, appartenenti ai fagotipi DT179, DT194, DT208, non hanno presentato alcun integrone.

Discussione

La presenza di due integroni di 1008 bp e 1133 bp contenenti i geni *psel* e *ant(3'')-Ia*, già evidenziata da Sanvang et al.(5) in ceppi di *Salm.* Typhimurium DT104 di origine suina, è stata confermata dai risultati della nostra ricerca su ceppi DT104 di origine umana

ed avicola oltre che su ceppi appartenenti a fagotipi differenti quali DT12, NT, U302 e RDNC. Di particolare interesse risulta inoltre l'individuazione, nei ceppi RDNC esclusivamente di origine umana, di due integroni rispettivamente di ~1450 e ~2100 bp contenenti al loro interno il gene *ant(3'')-Ia*. Questo aspetto potrebbe essere utilizzato con finalità epidemiologiche, se ulteriori indagini confermano il risultato da noi ottenuto. Ulteriori approfondimenti sono richiesti per individuare su quali dei due integroni sono localizzati i geni di resistenza antibiotica e per verificare, mediante l'analisi delle strutture cromosomiche fiancheggianti i due integroni, la presenza, nei fagotipi DT12, NT, U302, e RDNC dell'isola di antibiotico resistenza già individuata in *Salm. Typhimurium* DT104, DT120 e in *Salm. Agona* (1).

Bibliografia

1. Boyd D., Peters G.A., Cloeckert A., Boumedine K.S., Chalus-Dancla E., Imberechts H., Moulvey M.R. (2001). Complete Nucleotide sequence of a 43- kilobase

genomic island associated with the multidrug region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J. Bacteriol. 183(19): 5725-5732.

2. Briggs C., Fratamico P. F. 1999. Molecular characterization of the antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. Antimicrob. Agents. Chemother. 43:846-849.
3. Carattoli A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet. Res. 32: 243-259.
4. Llanes C., V. Kirchgerner, P. Plesiat. 1999. Propagation of TEM- and PSE- type β -lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. Antimicrob. Agents. Chemother. 43(10):2430-2436.
5. Sandvang D., F. M. Aarestrup, L. B. Jensen. 1998. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. 160: 37-41.
6. Threlfall E.J. 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 - a truly international multiresistant clone. J. Antimicrob.Chemother.46:7-10.

Tabella 1. Caratterizzazione genetica dell'antibiotico resistenza in ceppi di *Salm. Typhimurium* di origine umana ed avicola

Table 1. Genetic characterisation of antibiotic resistance of *Salm. Typhimurium* strains of human and poultry origin

Ceppo	Fagotipo	Origine	<i>tem</i> 1/2 489 bp	<i>psel</i> 419 bp	<i>ant3''-Ia</i> 526 bp	integr. 1008 bp	integr. 1133 bp	integr. 1450 bp	integr. 2100 bp	<i>int+psel</i> ~800 bp	<i>int+ant</i> ~750 bp
191	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
192	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
193	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
239	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
240	DT 104	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
241	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
242	DT 104	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
24	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	-	+
69	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	-	-
165	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
170	DT 104	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
58	DT 12	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
60	DT 12	Avicoli	-	+	+	+	-	-	-	+	+
63	DT 12	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
247	DT 179	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
246	DT 194	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
243	DT 208	Uomo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
248	DT 208	Uomo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	NT	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
66	NT	Avicoli	-	+	+	+	+	-	-	+	+
204	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	+	-	+
205	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
206	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
207	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
208	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
210	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
211	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
212	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
213	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	-	+	-	+
215	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
216	RDNC	Uomo	-	-	+	-	-	+	-	-	+
245	U 302	Uomo	-	+	+	+	+	-	-	+	+
TOTALE		32	4	16	27	16	15	10	2	14	26

COMUNICAZIONE 5

PRELIMINARY STUDY ON CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) ACTIVITY IN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATED IN ITALY

V. Bondioli¹, A. De Cesare¹, G. Manning², D. Newell² and G. Manfreda¹

¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, via S. Giacomo 9, 40126, Bologna, Italy

²Veterinary Laboratories Agency (Weybridge), New Haw, Addlestone, Surrey, UK

Key words: *Campylobacter jejuni*, poultry, poultry products, human, CDT

Risultati preliminari sull'attività della cytolethal distending toxin (CDT) in ceppi di *Campylobacter jejuni* isolati in Italia

Parole chiave: *Campylobacter jejuni*, pollame, carni avicole, uomo, CDT

Riassunto: Nonostante i dati epidemiologici internazionali confermino l'importanza di *Campylobacter jejuni* quale patogeno tossinfettivo umano, le conoscenze riguardo ai meccanismi di patogenicità rimangono ancora controverse e limitate. I principali fattori di virulenza a tutt'oggi conosciuti sono la motilità, l'aderenza, la capacità di invasione e la produzione di tossine. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare la produzione della tossina CDT (cytolethal distending toxin) in un gruppo di 29 isolati di *Campylobacter jejuni* isolati da diverse fonti (uomo, animali, alimenti ed ambiente) precedentemente caratterizzati mediante ribotipizzazione automatica. I risultati ottenuti hanno evidenziato un diverso livello di produzione di CDT in tutti gli isolati ad eccezione del ceppo n° 3 negativo per il test adottato. Il sequenziamento dei geni *cdt* in tale isolato ha evidenziato 16 sostituzioni nucleotidiche tre delle quali responsabili delle sostituzioni aminoacidiche che potrebbero essere alla base della mancata attività citotossica. Nessuna correlazione è stata osservata tra ribotipo, fonte di isolamento e livello di tossina prodotta.

Correspondence: Gerardo Manfreda, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via S. Giacomo 9, 40126 Bologna, Italy. Email: manfreda@alma.unibo.it

Introduction

Cytolethal distending toxin (CDT) production by *Campylobacter jejuni* was first described by Johnson and Lior in 1988 (3). CDT activity in culture supernatants caused several cultured cell lines, including HeLa and Vero cells, to become slowly distended over a 2- to 4- day period, after which the cell disintegrated and died (3). The *C. jejuni cdt* genes have been cloned and sequenced (4). CDT activity is encoded by three adjacent or slightly overlapping genes, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, which encode proteins predicted to have molecular weights of about 30,000, 29,000, and 21,000, respectively. The specific function of the CDT proteins are unknown, the predicted amino acid sequences are unlike those of any of the proteins in the available database (4). Lara-Tejero et al. (1) recently reported that the three sub-units, when

combined, interact with one other to form an active tripartite holotoxin. The actual target of the CDT remains undiscovered, however *C. jejuni* CDT causes HeLa cells to become blocked in the G₂ phase of the cell cycle (5).

The aim of this study was to investigate the cytolethal distending toxin (CDT) activity of 29 *Campylobacter jejuni* isolated from different sources and previously characterised by automatic *PstI* ribotyping.

Materials and Methods

Twenty-nine *Campylobacter jejuni* isolates from human, animal and food sources (Table 1), were screened with an *in vitro* HeLa cell cytolethal distending toxin assay (2,4): all of them were previously characterised with automatic *PstI* ribotyping.

Table 1- *Campylobacter* isolates in relation to different sources

Tabella 1- Isolati di *Campylobacter* in relazione all'origine

Nr.	SOURCE	RG	Nr.	SOURCE	RG
1	Broiler	103 S1	16	Poultry product	32 S1
2	Human	103 S1	18	Human	36 S5
3	Broiler	103 S3	19	Poultry product	36 S5
4	Human	103 S3	20	Poultry product	44 S5
5	Human	104 S1	21	Poultry product	44 S5
6	Poultry product	104 S1	22	Human	45 S2
7	Turkey	23 S2	23	Human	48 S4
8	Human	23 S2	24	Human	66 S2
9	Turkey	23 S4	25	Human	66 S3
10	Human	23 S4	26	Poultry slaughterhouse	67 S2
11	Human	26 S2	27	Poultry slaughterhouse	67 S5
12	Human	26 S2	28	Poultry product	99 S4
13	Poultry slaughterhouse	26 S2	29	Poultry product	99 S4
14	Human	30 S3	30	Poultry product	99 S4
15	Human	30 S3			

All the samples were tested with a PCR to screen for the *cdt* genes. All the isolates gave a PCR product of the expected size of 2.14 kb.

For the toxin assay, *Campylobacter* strains were grown on Muller Hinton plates for 24 hrs at 42°C in microaerobic atmosphere (10% CO₂, 85% N₂, 5% O₂) and harvested into Eagles Minimal Essential Medium.

The cell suspensions were measured at the OD₅₅₀, in triplicate and adjusted until the cell densities had a range of OD₅₅₀ 10⁶ - 10⁸. The bacterial suspensions were then applied, in a range of dilutions, to HeLa cells (2x10⁴ cells/ml) and incubated for 5 days at 37°C in 5% of CO₂. The treated monolayers were fixed, stained with crystal violet and examined with the microscope at x10 magnification. The toxin titre was defined as the reciprocal of the highest dilution of a preparation that affected 50% of the HeLa cells in a well of a 96-well assay plate. In the figure 1, the effect of CDT on HeLa cells is shown. Each strain was assayed in at least three independent assays and the reference strain *C. jejuni* NCTC 1168 was included.

Results and Discussion

As expected, the majority of *Campylobacter jejuni* strains make CDT, although the amounts made by different isolates can vary, as show in the figure 2. Moreover a significant variation in the toxin activity was observed among the 29 strain tested compared with the source and the ribogroup. Any correlation was observed between the ribotype, the source of isolates and the toxin activity. In fact, as show in previous research (4), the high toxin productions can't be associated with *Campylobacter jejuni* that cause diarrheal disease in human.

For the sample nr.3, negative for the toxin assay, reverse transcriptase PCR was used to confirm that the *cdt* genes of the strain are expressed. DNA sequencing was used to detect the difference between the nucleic sequence of the strain nr.3 compared with the reference strain *C. jejuni* NCTC 1168. 16

nucleotide substitutions were found within the sample nr.3 when compared with the sequence of the strain nr.168. Three of these resulted in an amino acid change: at position 88 in *cdtA* Ala>Val, at position 120 in *cdtB* Met>Thr and at the position 167 in *cdtC* Ile>Asn.

Expression analysis indicated that the genes are co-transcribed and therefore one or more of these changes in the *cdt* genes may be associated with loss of toxin activity in the strains after 5 days exposure to *C. jejuni* CDT

References

1. Lara-Tejero M. & Galan J. E. (2001). CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.*, 69: 4358-4365.
2. Hikcey T. E., McVeigh A. I., Scott D. A., Michielutti R. E., Bixby A., Carroll S. A., Bourgeois A. L. & Guerry P. (2000). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 68: 6535-6541.
3. Johnson W. M. & Lior H. (1988). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.*, 4: 115-126.
4. Pickett C. L., Pesci E. C., Cottle D. L., Russell G., Erdem A. N. & Zeytin H. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infect. Immun.*, 64: 2070-2078.
5. Withehouse C. A., Balbo P. B., Pesci E. C., Cottle D. L., Mirabito P. M. & Pickett C. L. (1998). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G₂-phase cell cycle block. *Infect. Immun.*, 66: 1934-1940.

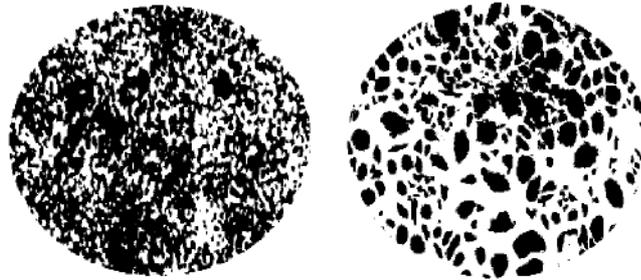
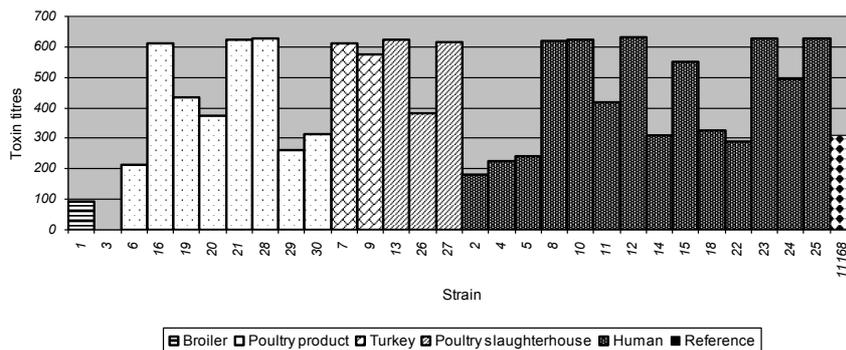


Figure 2 - Comparison of the CDT activities
 Figura 2 - Comparazione dell'attività della CDT



COMUNICAZIONE 6

INFEZIONE DA *HAFNIA ALVEI* IN GALLINE OVAIOLE

P. Casagrande Proietti, F. Passamonti, M.P. Franciosini, E. Del Rossi, G. Asdrubali

*Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria
Università degli Studi di Perugia*

Parole chiave: galline ovaiole, *Hafnia alvei*

***Hafnia alvei* infection in pullets in Italy**

Key words: pullets, *Hafnia alvei*

Summary: This paper reports the first outbreak in Italy caused by *Hafnia alvei* in pullets. The cloudy swelling and the fatty degeneration of liver associated with splenic lymphocytic depletion were the most prominent lesions. The organism was identified by biochemical and by a *Hafnia* specific bacteriophage test. Laying hens and pullets were experimentally infected by the oral and intraperitoneal route. The clinical and pathological effects were similar to those observed in naturally infected subjects.

Correspondence: Patrizia Casagrande Proietti- Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Perugia- Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo, 4- 06100, Perugia. E-mail patricasagrande@libero.it

Introduzione

Hafnia alvei è un germe gram negativo anaerobio facoltativo, che appartiene alla famiglia delle Enterobacteriaceae. E' diffuso nell'ambiente, in particolare nel terreno, nei liquami e nell'acqua. In letteratura, sono riportati casi di setticemia nelle trote e in galline ovaiole (3), di aborti nel cavallo, di forme respiratorie nelle capre e di mastiti nelle mucche (1). In medicina umana il microrganismo è stato associato a gastroenterite, a setticemia e ad infezioni urinarie (2). *Hafnia alvei* è considerato un patogeno opportunista che possiede meccanismi di virulenza sovrapponibili a quelli di altri enteropatogeni.

Con il presente lavoro si vuole descrivere un episodio morboso di notevole gravità insorto in un allevamento di galline ovaiole riconducibile ad infezione da *Hafnia alvei*.

Materiali e metodi

L'episodio manifestatosi durante il periodo invernale, ha colpito un allevamento di ovaiole costituito da circa 11000 pollastre non ancora entrate in deposizione, allevate in batteria. Le galline erano distribuite in un capannone unico e divise in due gruppi, ciascuno costituito rispettivamente da 5.580 soggetti di 18 settimane e da 5.780 soggetti di 12 settimane. Sono stati colpiti dalla malattia esclusivamente i soggetti del secondo gruppo che hanno presentato anoressia, abbattimento, penne arruffate, diarrea. I soggetti, sottoposti a terapia con amoxicillina, hanno presentato alla fine dell'episodio, mortalità elevata che ha raggiunto il 20,7%.

Esami anatomoistopatologici.

Dai soggetti sottoposti ad esame necroscopico sono stati prelevati campioni di fegato, cuore, milza, rene, polmoni, intestino, fissati in formalina tamponata al 10% e colorati con ematossilina-eosina, previa inclusione in paraffina.

Esami microbiologici.

Campioni di fegato, cuore, polmone, rene, milza, intestino, ovaio e cervello, sono stati seminati per impronta su piastre di agar sangue, e MacConkey agar messe ad incubare per 24 h a 37°C in condizioni di aerobiosi. Gli stessi campioni sono stati seminati per l'eventuale isolamento di *Salmonella spp.*, per cui sono stati impiegati terreni di arricchimento quali Brodo Selenite Cisteina e Rappaport-Vassiliadis, e terreni selettivi come Brilliant Green, Hektoen Enteric

Agar, e Kliger Iron Agar (Oxoid). Le piastre sono state messe ad incubare per 24 h a 37°C in condizioni di aerobiosi. I microrganismi isolati sono stati identificati tramite sistemi biochimici miniaturizzati (API 20 E e Rapid 20E).

Per confermare l'identificazione del microrganismo isolato è stato utilizzato un batteriofago specifico per *H. alvei* (fago 1672 ATCC) che ne consente una rapida differenziazione da *Salmonella spp.* Allo scopo sono state seminate piastre di Nutrient agar con *Hafnia* e piastre con altri germi quali *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *E. coli.*, utilizzate come controllo. Dopo aver aggiunto il fago le piastre sono state messe ad incubare a 37° C per 48-72 ore. Il fago 1672 determina placche di lisi soltanto in presenza di ceppi di *Hafnia*.

Il microrganismo isolato ed identificato come *Hafnia alvei* è stato utilizzato per effettuare una infezione sperimentale con una dose di microrganismi di 2×10^9 come descritto da Real *et al.* (1997).

Risultati

Reperti anatomopatologici

Il reperto più caratteristico è quello di un notevole aumento di volume del fegato (Fig.1) e della milza. Il fegato, in particolare, si presenta di colore più pallido, occupando talvolta tutta la cavità addominale mentre la milza raggiunge spesso dimensioni di 3-4 volte la norma. Nella maggior parte dei casi è apprezzabile anche enterite catarrale.

Reperti istologici

Le lesioni istopatologiche osservate sui campioni di organi si collocano nel quadro comune delle infezioni setticemiche sostenute da batteri della Fam. Enterobacteriaceae.

La lesione più caratteristica è rappresentata da degenerazione torbido-grassa del fegato associata spesso a necrosi focale, periangiocolite, infiltrazione linfo-monocitaria diffusa e presenza di centri di aggregazione batterica nelle strutture duttali e negli spazi porto-biliari. La milza mostra evidenti fenomeni di deplezione linfocitaria (Fig. 2) e foci di necrosi fibrinoide associata volte a splenite granulomatosa.

Reperti microbiologici

Gli esami batteriologici effettuati hanno consentito di isolare in purezza da tutti i campioni di organi esaminati un germe gram negativo bastoncellare che sul MacConkey cresce con colonie piccole e traslucide, lattosio negative, non produttrici di H₂S. Il

microorganismo isolato è stato identificato attraverso prove biochimiche come *Hafnia alvei*; il test con il batteriofago 1672 ha consentito di evidenziare nelle piastre di Nutrient agar, seminate con *Hafnia*, placche di lisi che al contrario non è stato possibile osservare in quelle seminate con altri batteri. I risultati relativi alla infezione sperimentale sono espressi nella tabella 1.

Discussione

I risultati ottenuti ci consentono di trarre alcune considerazioni sull'episodio sopra descritto. Innanzi tutto è da rilevare che tale forma morbosa, fino ad oggi, non è stata segnalata nel nostro Paese, ed è la prima osservazione in pollastre non ancora in deposizione. A differenza di quanto osservato da Real *et al.*, (1997) che hanno descritto un caso di setticemia con elevata mortalità in galline ovaiole di 30 settimane, l'infezione ha interessato un gruppo di pollastre di 12 settimane, con mortalità che ha raggiunto nel nostro caso il 20,7%. Per quanto riguarda i sintomi da noi riscontrati, è da notare che sono poco caratteristici e del tutto sovrapponibili ad una forma setticemica riconducibile a *Salmonella spp.*, mentre le lesioni sono da considerare piuttosto particolari per l'aspetto del fegato ed il notevole aumento di volume della milza. Anche da un punto di vista batteriologico *Hafnia alvei* e *Salmonella spp.* sono molto simili; crescono infatti entrambi su agar MacConkey formando colonie difficilmente distinguibili morfologicamente e inoltre, possiedono caratteristiche biochimiche simili. Ne consegue che l'applicazione del test biochimico API 20 E può essere considerato il primo passo verso la diagnosi, che dovrebbe essere confermata o mediante l'utilizzo del batteriofago specifico per l'*Hafnia*, come da noi effettuato o mediante sistemi di identificazione più sensibili come il Sistema Microscan WalkAway (4). Un'ulteriore considerazione merita di essere fatta sul ruolo patogeno svolto da *Hafnia alvei*. Esso è considerato un germe patogeno opportunista in numerose specie. Non escludendo tale eventualità, è da sottolineare che nell'episodio da noi osservato è verosimile pensare che l'agente in causa possa determinare la malattia senza l'intervento di fattori predisponenti come farebbe supporre quanto verificatosi nell'infezione sperimentale. Nell'episodio insorto naturalmente è comunque stato isolato il microorganismo in purezza da tutti gli organi, così come nella prova sperimentale, che ha confermato l'elevata patogenicità del germe; è stato possibile, infatti, riprodurre sperimentalmente in modo costante ed identico i sintomi clinici e le lesioni anatomo-patologiche osservate in campo.

Bibliografia

1. Binde M., Hermansen O. (1982). *Hafnia alvei* in mastitis secretion, a case report. Nordisk Veterinaermedicin. 94, 569-570.
2. Ramos A., Damaso D. (2000). Extraintestinal infection due to *Hafnia alvei*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. Dis. 19, 708-710.
3. Real F., Fernandez A., Acosta F., Acosta B., Castro P., Deniz S., and J. Oros. (1997). Septicemia associated with *Hafnia alvei* in laying hens. Avian Diseases 41,741-747.
4. Rodriguez L. A., Vivas J., Gallardo C.S., Acosta F., Barbeyto L., and Real F. (1999). Identification of *Hafnia alvei* with the MicroScan WalkAway System. Journal of Clinical Microbiology . Dec. 4186-4188.

Figura 1. Aumento di volume del fegato in galline infette da *Hafnia alvei*.

Figure 1 .Enlargment of the liver in egg laying hens infected with *Hafnia alvei*.



Figura 2. Milza con evidente deplezione linfocitaria in galline infette da *Hafnia alvei*. Ematossilina-eosina

Figure 2. Severe lymphocytic depletion of the spleen in egg laying hens infected with *Hafnia alvei* . HE

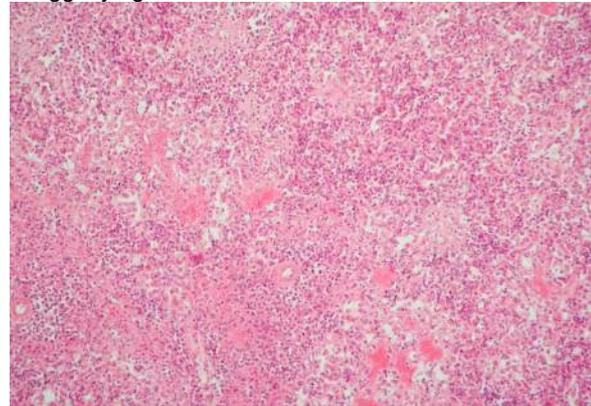


Tabella 1. Risultati relativi all'infezione sperimentale di pollastre e di galline ovaiole con *Hafnia alvei*.

Table 1. Results of the experimental infection of pullets and laying hens with *Hafnia alvei*

N.sogg. inoc.	Via * Inoc.	Segni clinici	Esito inf. (giorniP.I)	Les ioni	R.** germe
1 poll.	IP	+	Morta (6)	+	+
2 poll.	IP	+	Morta (8)	+	+
3 pol.	IP	+	Morta (8)	+	+
4 poll.	O	+	Morta (6)	+	+
5 poll.	O	-	Morta (23)	-	-
6 poll.	O	-	Sopp. (28)	-	-
7 gall.	IP	+	Morta (6)	+	+
8 gall.	IP	+	Morta (6)	+	+
9 gall.	IP	+	Morta (9)	+	+
10 gall.	O	+	Morta (6)	+	+
11 gall.	O	+	Morta (6)	+	+
12 gall.	O	+	Morta (6)	+	+
13 contr.	IP	-	Sopp. (28)	-	-
14 contr.	IP	-	Sopp. (28)	-	-
15 contr.	O	-	Sopp. (28)	-	-
16 contr.	O	-	Sopp. (28)	-	-

*IP=intraperitoneale, O= orale

**Reisolamento del germe da fegato, milza, rene, cuore, intestino, cervello, ovaio, polmoni.

COMUNICAZIONE 7

SINDROME ISCHEMICA DEL GHEPPIO (*FALCO TINNUNCULUS*): SEGNALAZIONE DI 9 CASI RINVENUTI IN CAMPANIA (ITALIA)

A. Baiano¹, G. Matteoli¹, L. Dipineto¹, M. Kalbi², S. Troisi², M. Calabria, L.F. Menna,¹ A. Fioretti¹

¹Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli – Italia; ²Stazione Monitoraggio Ambientale Monti Picentini, Montella (AV) – Italia.

Parole chiave: gheppio, sindrome ischemica, eparina.

Ischemic Syndrome of the Kestrel (*Falco tinnunculus*): description of 9 cases discovered in Campania (Italy).

Key words: kestrel, ischemic syndrome, heparin.

Summary: The AA present a description of 9 clinical cases of Ischemic syndrome of the kestrel found in the Campania Region. The subjects presented a characteristic symptomatology linked to aseptic necrosis from ischemia at the tips of their wings starting from the third proximal of the carpus-metacarpus and the tip of the pelvic girdle affected by the third proximal of the tarsus-metatarsus. After a week, there was a complete mummification in all the cases followed by the detachment of the interested areas. One bird, in a very early stage of the disease, was successfully treated topically with heparin sodica.

Correspondence: Alessandro Fioretti, Centro Sperimentale Avicunicolo, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Staffetta, 42-80014 Giugliano (NA), fioretti@unina.it

Introduzione

Il Gheppio (*Falco tinnunculus*) è tra i più diffusi rappresentanti della famiglia dei Falconidi. La popolazione italiana è costituita da circa 5.000-10.000 coppie diffuse su tutto territorio peninsulare (4).

Nel periodo compreso tra Febbraio 2001 a Luglio 2003 sono pervenuti, presso il Centro di Recupero Fauna Selvatica in Campania gestito dalla Comunità Montana Terminio-Cervialto di Montella (AV) 9 esemplari di gheppio, condotti successivamente a visita presso il Centro Sperimentale Avicunicolo di Varcaturò, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale. Tutti gli esemplari presentavano un quadro clinico di varia gravità, ascrivibile alla Sindrome Ischemica del Gheppio. Questa patologia è stata segnalata da Delogu e coll. (2) nel 1996 i quali descrivevano una sindrome caratterizzata da una necrosi asettica, con mummificazione e distacco dell'estremità distale degli arti (zampa e ala).data, secondo l'ipotesi eziopatogenetica dell'autore, da una trombosi, della rete vascolare arteriosa tarsale e della biforcazione dell'arteria ulnare, seguito ad un'infezione da emoparassiti del genere *Plasmodium* e/o *Haemoproteus*, in soggetti immunodepressi.

Materiali e Metodi

Dal Febbraio 2001 al Luglio 2003 sono stati ricoverati 9 esemplari di gheppio (*Falco tinnunculus*) presso il nostro centro con un quadro clinico caratterizzato da necrosi asettica alle estremità distali degli arti.

Gli esemplari osservati appartenevano a varie classi di età, tre pulli e sei sub-adulti.

Tre volatili facevano parte della medesima nidata costituita da 4 esemplari di cui uno non presentava segni clinici.

All'esame clinico si evidenziavano lesioni sovrapponibili in tutti i soggetti sia per localizzazione che per progressione.

Le lesioni erano localizzate alle ali a partire dal terzo prossimale del carpo-metacarpo e all'estremità dell'arto pelvico, interessato dal terzo prossimale del tarso-metatarso. Nelle prime fasi della malattia le zone interessate si presentavano all'osservazione dapprima con estremità necrotiche, con articolazioni metatarso falangea aumentate di volume e successivamente, disidratandosi, hanno assunto un colorito brunoastro fino ad una completa mummificazione (Fig.1).

Gli animali presentavano sensorio vigile, con discreto appetito reagivano, infatti positivamente all'imbeccamento. Alcuni soggetti hanno mostravano tendenza ad autotraumatismi fino ad arrivare al totale distacco delle parti interessate (estremità delle ali e falangi) (Fig.2).

I volatili presentavano in questa fase gravi difficoltà a mantenere la stazione eretta mentre lo stato generale è andato progressivamente peggiorando. Cinque soggetti sono deceduti spontaneamente, mentre tre sono stati soppressi.

Dopo visita clinica sono stati effettuati i seguenti esami: anatomopatologico, coprologico, esame di strisci ematici, radiografico, batteriologico e istopatologico (1,5).

Un esemplare pervenuto in una fase precoce della malattia, con interessamento esclusivo delle prime falangi (due dita) della zampa destra ed una lesione a carico dell'ala sinistra, è stato sottoposto ad una terapia con anti-coagulanti (gel di eparina) per via topica

Dopo circa 1 settimana di trattamento si è avuto un arresto della progressione delle lesioni e un recupero completo dell'ala e la perdita di sole due falangi a carico della zampa sinistra (Fig.3).

Figura 1 Mummificazione zampa sx.

Figure 1 Mummification claw sx.



Figura 2 Gheppio, moncone zampa sx.
Figure 2 Kestrel, stump of a claw sx.



Figura 3 Zampa post-trattamento.
Figure 3 Claw after the treatment



Risultati

Gli esami radiologici hanno permesso di escludere traumatismi o lesioni da arma da fuoco.

Inoltre il piumaggio adiacente alle lesioni è stato osservato allo stereomicroscopio, al fine di poter escludere eventuali danni dovuti ad elettrocuzione (2). Gli esami anatomo-patologici hanno evidenziato dei quadri aspecifici caratterizzati da aumento di volume del fegato (5 soggetti) e della milza (4 soggetti) enterite catarrale,(7 soggetti) e lesioni degenerative a carico dei reni (3 soggetti).

Gli esami parassitologici eseguiti su contenuto intestinale prelevato in sede necroscopica; hanno dato esito negativo.

Dagli esami batteriologici eseguiti su campioni d'organo, di fegato, milza, intestino, cervello e dalle lesioni alle zampe ed alle ali. è stato possibile isolare *E.coli* (9 soggetti) *Pseudomonas* spp, ,(6 soggetti) *Enterobacter cloacae* (3 soggetti). Mentre dalle lesioni agli arti è stato possibile isolare *Stafilococcus* (non emolitici) spp (5 soggetti) e *Pseudomonas* spp. (4 soggetti) Inoltre in un caso, in seguito ai rilievi necroscopici, è stato possibile isolare *Aspergillus fumigatus*.

Dall'osservazione degli strisci ematici allestiti a partire da sangue periferico, non è stata evidenziata la presenza di emoparassiti.

L'esame istologico eseguito su sezioni allestite a partire da porzioni di segmenti delle estremità distale e prossimale, rispettivamente degli arti inferiori e superiori, ha rilevato quadri di trombosi arteriosa.

Conclusioni e Discussione

I risultati ottenuti non consentono di apportare nuovi dati in merito alla eziopatogenesi di questa sindrome. I dati raccolti concordano con quanto già riportato in letteratura (1). Le lesioni evidenziate confermano la patogenesi riportata da Delogu e coll., la patologia infatti è stata evidenziata, prevalentemente in giovani soggetti, con una frequenza maggiore di casi evidenziati, nel periodo autunnale sei casi.

Inoltre il rinvenimento di una nidiata in cui 3 giovani su 4 erano affetti dalla sindrome, confermerebbe quanto supposto da Delogu e coll. in merito alle modalità attraverso cui si instaura l'infezione, cioè attraverso l'infestazione dei nidiacei da ditteri ematofagi del genere *Culex*, i quali fungono da serbatoi degli emoparassiti.

Dagli esami anatomo-patologici sono state evidenziate in tutti i casi lesioni ascrivibili a necrosi asettica dovuta ad un quadro di trombosi arteriose localizzate prevalentemente alla rete vascolare tarsale e a livello della regione carpale., confermata dagli esami istologici.

Il risultato negativo in merito alla ricerca degli emiparassiti è compatibile con l'ipotesi eziologica, in quanto in questo tipo di infezioni la fase eritrocitaria è di breve durata, quindi non sempre presente in associazione alle lesioni osservate.

I risultati degli esami batteriologici non sembrano correlati al quadro eziopatogenetico ma legati a fenomeni di irruzione secondaria, in animali stressati e frequentemente rinvenuti in cattive condizioni fisiche.

Lo studio di nuovi casi consentirà in futuro di chiarire il quadro eziopatogenetico di questa patologia. in modo da poter tentare di intervenire tempestivamente e tutelare al meglio la salute della avifauna selvatica.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Sig.ra Fortuna Pisa per la preziosa collaborazione tecnica.

Bibliografia

1. American Association of Avian Pathologists, (1998) Isolation and Identification of Avian Pathologists. 4 ed, Rose printing, Tallahassee, Florida.
2. Delogu M., Catelli E., Sanguinetti V., De Marco M.A., Guberti V., Govoni S. (1996), Sindrome Ischemica del Gheppio (*Falco tinnunculus*):descrizione ed ipotesi eziopatogenetica. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina XXIV:199-209
3. Haas D., (1993) Clinical signs and treatment of large birds injured by electrocution. In: Redig P.T., Cooper J.E., Remple D., Hunter D.B., Raptor Biomedicine, University of Minnesota Press, Minneapolis.
4. Tucker G.M., Heath M.F. (1994) Birds in Europe, their conservation status. Cambridge, UK: BirdLife International.
5. Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (1994) Avian Medicine: principles and application, Wingers Publishing, Inc., Lake Worth, Florida.

COMUNICAZIONE 8

REPERTI AUTOPTICI IN RAPACI ED UCCELLI SELVATICI ACCOLTI DAL CRAS - WWF DI CASERTA NEL BIENNIO 2001 - 2003

A. Baiano¹, L. Dipineto¹, G. Matteoli¹, A. Argenio², A. Piccirillo³, L.F. Menna¹, A. Fioretti¹

¹Dip. di Patologia e Sanità Animale, Università di Napoli Federico II; ²CRAS del WWF "Oasi del Bosco di S. Silvestro", San Leucio, Caserta; ³Dip. di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università di Padova

Parole chiave: Reperti autoptici, CRAS, uccelli selvatici, uccelli rapaci

Pathological finding in birds of prey and wild birds received from CRAS – WWF of Caserta during the period 2001 - 2003

Key words: Pathological finding, recovery centre, wild birds, birds of prey

Summary: We were carried out necropsy in 69 birds (birds of prey and wild birds) consigned from a recovery centre (CRAS). We found various lesions like traumas, hepatic lesions, enteritis, uricosis, parasitosis, mycosis. We attribute the cause of most of the lesions found to the stress, diet and recovery conditions.

Correspondence: Alessandro Fioretti, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli Federico II, via Delpino, 1, 80137, e-mail: fioretti@unina.it

Introduzione

Gli uccelli rapaci, in quanto predatori e quindi al vertice della catena alimentare, sono importanti indicatori, nonché vittime, della degradazione ambientale, degli abusi e degli errori commessi nella gestione di aree un tempo incontaminate. Considerati da molti, erroneamente, nocivi e pericolosi sono stati sottoposti ad una caccia indiscriminata. Inoltre, con l'avanzare dell'urbanizzazione, si sono persi i loro abituali luoghi di nidificazione, come nel caso del falco di palude (*Circus aeruginosus*) per il progressivo prosciugamento delle aree umide. Ad aggravare la situazione, contribuisce spesso la triste e recidiva insensatezza di alcuni cacciatori e bracconieri che non esitano a sparare su questi animali protetti favorendone l'estinzione (3). Fortunatamente, nel tentativo di controbilanciare la situazione generale, operano in Italia numerosi Centri di Recupero per Animali Selvatici (CRAS), i quali, assieme ad altre associazioni volontarie (LIPU, WWF) contribuiscono alla cura ed alla riabilitazione degli uccelli selvatici feriti. Purtroppo, il futuro e le sorti di tali volatili, come dei centri di recupero e delle altre strutture protezionistiche, sono strettamente dipendenti dall'evoluzione e dallo sviluppo delle ricerche scientifiche su queste specie. Tale indagine vuole fornire un quadro delle lesioni anatomo-patologiche di più frequente riscontro e valutare la presenza di agenti patogeni in carcasse di uccelli selvatici, al fine di evidenziare le cause di malattia e decesso nell'avifauna selvatica. Inoltre si vuole fornire utili indicazioni ai Centri di Recupero per ottenere una valutazione prognostica più precisa ed evitare così inutili sofferenze agli animali irrecuperabili.

Materiali e Metodi

Nel biennio 2001-2003, sono pervenuti, al Dipartimento di Patologia e Sanità Animale dell'Università di Napoli Federico II, 69 carcasse di uccelli selvatici, provenienti dal CRAS del WWF "Oasi del Bosco di S. Silvestro" di San Leucio (CE). Le specie osservate sono state complessivamente 17, appartenenti a 8 famiglie (Tabella 1).

Esame necroscopico: veniva eseguito per ogni soggetto e comprendeva sia un esame esterno per evidenziare le condizioni generali, che un esame interno per rilevare eventuali lesioni macroscopiche, e prelievo di campioni di organo destinati alle indagini di

laboratorio.

Esami di laboratorio: venivano effettuati su campioni di fegato, milza, intestino e cervello per la ricerca di Enterobatteri patogeni e batteri Gram positivi, nonché, su sacchi aerei e polmone del Cigno reale, per la ricerca di miceti sulla base dei rilievi autoptici.

Risultati

Nel 55% dei casi esaminati, le lesioni maggiormente rappresentate (Tabella 1), risultavano quelle traumatiche (fratture, lesioni da arma da fuoco), nonché quelle epatiche (aumento di volume dell'organo, lesioni degenerative) e gastroenteriche (enterite catarrale, enterite emorragica) in percentuale rispettivamente del 23% e 19%. Nel 17% dei casi esaminati, si riscontravano depositi di urati a livello di reni, ureteri, e nei casi gravi a carico di tutte le sierose. In corso di esame necroscopico, inoltre, si evidenziavano parassiti allo stadio adulto in 7 uccelli esaminati. In particolare, si rilevava la presenza di nematodi nell'intestino tenue di un gheppio e di un airone; una tenia nell'intestino di una poiana, nonché infestazione dei sacchi aerei da *Serratospiculum spp.* in tre Falchi pellegrini. Nell'esofago di un gufo si riscontrava la presenza di *Capillaria spp.* Nove esemplari di gheppio, inoltre, manifestavano i segni clinici della c.d. Sindrome Ischemica del Gheppio (1). Per quanto riguarda gli esami batteriologici, gli isolamenti più frequenti risultavano rappresentati da *Escherichia coli* e in percentuale minore da *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.* ed *Enterobacter cloacae*. Si isolava *Pseudomonas spp.* nel 40% dei campioni esaminati e *Salmonella* da fegato, milza ed intestino di un Falco pellegrino ed un Airone cenerino identificate rispettivamente come *Salmonella hadar* e *Salmonella typhimurium*. Non si isolavano Gram positivi patogeni. Infine, in un Cigno reale, si evidenziava la presenza di *Aspergillus spp.* dai sacchi aerei e dal polmone.

Discussione e Conclusioni

Le lesioni riscontrate evidenziano come i traumi da arma da fuoco siano più frequenti nell'avifauna selvatica e quindi il bracconaggio sia una delle principali cause di ricovero. Alle lesioni epatiche non è stato possibile attribuire una eziologia certa, in quanto spesso presenti in esemplari in cattivo stato di conservazione. Per quanto concerne le lesioni gastroenteriche, riscontrate in soggetti in precarie condizioni fisiche, stressati e che non si alimentavano,

sono state interpretate come gastroenterorragie da stress, digiuno, shock, in concordanza con quanto segnalato da altri autori (2). Le lesioni renali, caratterizzate da uricosi, potrebbero essere ascrivibili ad un'alimentazione iperproteica, aggravata da condizioni di disidratazione che spesso si verificano in seguito ai lunghi periodi di degenza nei centri di recupero. Poiché gran parte degli animali esaminati erano stati precedentemente congelati, non è possibile escludere l'eventualità che tale sistema di conservazione, possa aver influito sull'esito della ricerca. Tale ipotesi viene in parte confermata dall'isolamento di *Serratia spp.*, e *Pseudomonas spp.* Per quanto riguarda il rilevamento di *E. coli*, bisogna ricordare che esso viene considerato un normale costituente della flora intestinale degli uccelli selvatici per cui non è da escludere una sua possibile diffusione post-mortem ad altri organi. In particolari condizioni di stress (sovraffollamento, carenze igieniche, cattiva alimentazione, ecc.), tuttavia, la virulenza del microrganismo può aumentare, complicando patologie già in atto. I risultati confermano la presenza di batteri del genere *Salmonella* nell'avifauna selvatica. Nel nostro caso, le uniche lesioni associate all'isolamento di *Salmonella* rispettivamente in un esemplare di Falco pellegrino e Airone cenerino, sono state una peritonite e un lieve aumento di volume di fegato e milza. Non è possibile definire con certezza se l'infezione, con ogni probabilità di origine alimentare, sia dovuta al consumo di carne di pollame infetto, somministrata nel periodo di degenza, oppure alla predazione di animali infetti. Per quanto riguarda i nove gheppi affetti da sindrome ischemica, i risultati evidenziati non consentono di apportare nuovi dati in merito alla eziopatogenesi di tale sindrome. Il reperimento di

parassiti nei rapaci così come di *Aspergillus spp.* nel Cigno reale non è rilevante data l'elevata incidenza di casi simili in esemplari in riabilitazione; importante, invece, è prendere in considerazione l'eventuale rischio zoonosico che questi uccelli possono rappresentare. Di conseguenza debbono essere prese particolari precauzioni dal personale addetto alla gestione degli animali per evitare un'eventuale inalazione delle spore che contaminano voliere, posatoi ed attrezzature varie (4). Alla luce dei risultati ottenuti, riteniamo opportuno che nei centri di recupero siano apportate idonee misure igienico-sanitarie ed eseguiti controlli batteriologici di routine sui volatili ospitati, al fine di evidenziare in essi la presenza di eventuali agenti patogeni e di zoonosi.

Ringraziamenti

Si desidera ringraziare la Dott.ssa Antonia Ricci per la tipizzazione dei ceppi di *Salmonella* e la Sig.ra Fortuna Pisa per la valida collaborazione tecnica.

Bibliografia

1. Delogu M., Catelli E., Sanguinetti V., De Marco M.A., Guberti V., Govoni S. (1996) Sindrome Ischemica del Gheppio (*Falco tinnunculus*): descrizione ed ipotesi eziopatogenetica. Suppl. Ric. Biol. Selvaggina XXIV:199-209
2. Gallazzi D., Amoruso L., Granata R., Grilli G., Vigorita V. Reperti autoptici in uccelli rapaci del nord Italia nel quinquennio 1991-1995. . Atti del II Seminario Nazionale sui Centri di Recupero Animali Selvatici, Riserva Naturale Bosco WWF di Vanzago (MI), 17-18 Giugno 1995, Serie Atti e Studi n.11, Cogecstre Edizioni, pp 66-73.
3. Macaluso A. *Sci. Vet.*, 3: 38-41, 1985.
4. Mariani F., Cerrone A., Calabria M., Menna L.F., Fioretti A., Valentino M.: Aspergillosi in un centro di recupero animali selvatici: possibile rischio zoonotico. Giornate Scientifiche delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Farmacia e Medicina Veterinaria, 17-19 maggio 200, Napoli, Poster n.298, pag.367

Tabella 1: Specie esaminate e lesioni riscontrate nel periodo 2001-03

Table 1: Species investigated and lesions found during the period 2001-03

Famiglia	Specie	N°	Lesioni						Altre*
			Traumi	Epatiche	Gastro-enteriche	Uricosi	Parassitarie	Micotiche	
Accipitridae	Albanella minore (<i>Circus pygargus</i>)	1	12	4	4	6	1		9
	Falco di palude (<i>Circus aeruginosus</i>)	1	8	2		1	1		1
	Sparviere (<i>Accipiter nisus</i>)	5	4	2	1	1			2
	Poiana (<i>Buteo buteo</i>)	13	1	1					
Falconidae	Gheppio (<i>Falco tinnunculus</i>)	19	3	1	2		1		1
	Falco pellegrino (<i>Falco peregrinus</i>)	4	2	2	1		1		2
Strigidae	Allocco (<i>Strix aluco</i>)	1	3	2	3	2	3		
	Civetta (<i>Athene noctua</i>)	6	1						1
	Gufo comune (<i>Asio otus</i>)	4	1	1		1			
Tytonidae	Barbagianni (<i>Tyto alba</i>)	2	1		1				
Ardeidae	Airone cenerino (<i>Ardea cinerea</i>)	5				1			
	Sgarza ciuffetto (<i>Ardeola ralloides</i>)	1	1						1
	Tarabuso (<i>Botaurus stellaris</i>)	1							1
	Tarabusino (<i>Ixobrychus minutus</i>)	3			1				
Anatidae	Cigno reale (<i>Cygnus olor</i>)	1		1				1	
Rallidae	Folaga (<i>Fulica atra</i>)	1							
Picidae	Picchio rosso maggiore (<i>Dendrocopos major</i>)	1	1						
TOTALE		69	38	16	13	12	7	1	18

COMUNICAZIONE 9

VALUTAZIONE DI TRATTAMENTI INNOVATIVI PER LA PASTORIZZAZIONE-STERILIZZAZIONE DELLE UOVA IN GUSCIO

C. Ferroni³, G. Coccoli², G. Baronio², S. Piazza², F. Paterlini¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Bergamo; ²Itaca S.p.A. Brescia;

³Medico Veterinario Specializzando in Tecnologia e Patologia Avicunicola e degli Animali Selvatici

Parole chiave: uova, *Salmonella enteritidis*, microonde

Evaluation of new treatments for pasteurisation-sterilization of shell eggs

Key words: eggs, *Salmonella enteritidis*, microwave

Summary: We studied a preliminary treatment for pasteurization/sterilization of commercial shell eggs suitable to eliminate *Salmonella enteritidis* by microwave oven. The following describes preparation, inoculation of samples, times and methods of treatment. The data we have described are preliminary data but these highlight the importance of some results in class number eleven, where, we obtained an 80% decrease of *Salmonella enteritidis*; organoleptic characteristics remained unchanged.

Correspondence: Carlotta Ferroni, Medico Veterinario, via Farini n°71 43100 Parma, c_ferroni@libero.it

Introduzione

Salmonella enterica serovar *enteritidis* è un batterio causa di episodi di tossinfezione alimentare. Il rischio di contaminazione per l'uomo rimane elevato qualora si utilizzino prodotti d'uovo e ovoprodotti non sottoposti a nessun trattamento (2,3). La contaminazione delle uova da *Salmonella enteritidis* si verifica per trasmissione interna (verticale) nel tratto riproduttivo e ciò avviene prima della formazione del guscio stesso (3,4).

Spesso i volatili si comportano da portatori sani di *Salmonella enteritidis* e per di più risultano essere eliminatori in modo incostante, è quindi difficile monitorare la presenza del microrganismo nell'allevamento; pertanto è necessario individuare un valido sistema di decontaminazione delle uova che permetta fra l'altro di aumentarne la conservabilità.

I casi di malattia causati da *Salmonella enteritidis* nell'uomo sono aumentati a livello mondiale dagli anni 70 e dal 1990 questo serovar ha soppiantato *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* come causa primaria di salmonellosi nel mondo (1,2). Fra i metodi fisici attualmente utilizzati per la stabilizzazione alimentare, il processo a microonde è, in certe situazioni, il più vantaggioso nel rapporto qualità finale del prodotto-economicità del processo oltre ad essere una delle poche tecnologie che permettono il trattamento dell'alimento dopo il suo confezionamento. Altro punto di forza del trattamento a microonde è rappresentato dalla rapidità delle fasi di applicazione.

L'azione delle microonde è influenzata dalle caratteristiche legate al prodotto (umidità, contenuto ionico del cibo, densità, forma, peso e volume) e all'impianto (forma della cavità risonante, potenza di erogazione delle microonde e diverse cinematiche del prodotto all'interno campo).

Scopo del seguente lavoro è quello di verificare l'applicabilità della tecnologia microonde per il trattamento termico delle uova in guscio senza provocare alterazioni organolettiche evidenti nelle uova.

Tale lavoro è frutto della collaborazione tecnico-scientifica tra ditta Itaca e IZSLER di Brescia. Nell'ambito di questa collaborazione iniziata nel 2001 sono stati raccolti dati relativi a oltre 200 esperienze effettuate su uova da consumo.

Materiali e metodi

Allestimento della prova: sono state utilizzate uova fresche di categoria A del commercio e sottoposte a controlli per escludere la presenza di salmonella. Per ogni prova sono state previste 4 uova inoculate e 4 controlli negativi da sottoporre a trattamento e 2 controlli positivi non trattati.

Preparazione dell'inoculo: partendo da una coltura di *Salmonella enteritidis* di 24 ore a 37°C in BHI è stata allestita, in soluzione fisiologica sterile, una sospensione batterica pari allo 0,5 Mac Farland (10^7 - 10^8 ufc/ml). Di tale sospensione è stata effettuata una diluizione 1:10 in tuorlo sterile ed è stata verificata la contaminazione (ufc/ml) mediante semina per inoculo in superficie di Plate Count Agar ed Hektoen Enteric Agar. La coltura è stata poi debitamente diluita, sempre in tuorlo d'uovo sterile, per ottenere un titolo pari a 10^3 ufc/0,1ml, volume utilizzato per l'inoculo di ogni singolo uovo.

Inoculazione uova: le modalità di inoculazione hanno previsto, disinfezione con soluzione alcool-iodata del guscio a livello del punto di inoculo sito al polo ottuso dell'uovo, foratura del guscio tramite punzone sterile e inoculazione. Per simulare la situazione reale di contaminazione sono stati introdotti 0,1 ml di tuorlo contaminato con *Salmonella enteritidis* direttamente nel tuorlo. I fori praticati nel guscio sono stati poi richiusi con materiale inerte a base calcica. Le uova contaminate sono state immediatamente sottoposte ai trattamenti previsti per evitare variazioni nella carica.

Trattamento a microonde: le uova, contaminate e non, sono state poste in contenitori trasparenti alle microonde che hanno permesso il trattamento nell'impianto pilota. Le uova non contaminate sono state forate per monitorare, tramite sensori a fibre ottiche, la temperatura di albume e tuorlo durante tutte le fasi. All'interno dell'impianto sono stati previsti sistemi in grado di sottoporre i campioni a radiazioni il più possibile uniformi mediante diverse combinazioni di movimenti rotatori e traslatori. La potenza massima sviluppata dal sistema a microonde utilizzato è di 4KW; un software opportunamente ideato e realizzato permette di modulare potenze, tempi di esposizione e modalità di movimento cui i campioni sono sottoposti. Il prototipo è stato realizzato rispettando le norme sulla sicurezza; la potenza delle microonde all'esterno è stata continuamente monitorata con strumento

certificato affinché non superasse i limiti massimi imposti dalla legge.

Verifica delle caratteristiche organolettiche: è stato costituito e viene continuamente arricchito, grazie all'esperienza acquisita, un panel per individuare, definire e valutare le caratteristiche organolettiche dell'uovo dopo il trattamento a microonde (torbidità dell'albume, tensione superficiale della membrana vitellina, presenza-assenza di coaguli sia in albume sia tuorlo). Le uova non inoculate sono state immediatamente ispezionate ed è stata compilata la relativa scheda di valutazione organolettica.

Verifica microbiologica: la ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata mediante metodica Vidas, test immunoenzimatico automatizzato. Sono state effettuate analisi sui campioni sottoposti a trattamento, sui controlli positivi e negativi previsti dai protocolli sperimentali.

Risultati e discussione

Per definire le classi di trattamento sono state valutate le costanti di tempo della salita e discesa in temperatura di tuorlo e albume in diversi mezzi (aria, acqua e microonde). Abbiamo anche valutato il peso dell'uovo ed il Ph prima e dopo il trattamento senza riscontrare variazioni apprezzabili. Abbiamo inoltre verificato la riduzione logaritmica di *Salmonella* a varie temperature con inoculazioni elevate.

Nella Tabella n° 1 abbiamo rappresentato i risultati ottenuti con diverse classi di trattamento.

Al fine di salvaguardare la riservatezza dei dati della ditta Itaca non viene specificata nel dettaglio la modalità dei trattamenti. Per indicare il degrado delle caratteristiche organolettiche di albume e tuorlo si sono usati i seguenti simboli in modo crescente: ok, +/-, +, ++, +++, la presenza del simbolo "+" evidenzia situazioni di degrado. Tali simboli sono frutto di considerazioni effettuate su tutti i parametri utilizzati come panel. Per ogni tipologia di trattamento sono state processate in tempi diversi più uova per valutare la ripetibilità e l'efficacia del trattamento. Il grado di soddisfazione della singola classe di trattamento è stato ricavato considerando la percentuale di abbattimento di *Salmonella enteritidis* ottenuta con quella classe e le caratteristiche di albume e tuorlo.

Abbiamo poi individuato un limite di accettabilità del trattamento (linea rossa nella Fig.1) dato da una percentuale minima di abbattimento del 50%, e da assenza di coaguli nell'uovo.

Dal grafico di Figura 1, il risultato più significativo che emerge riguarda la classe 11 di trattamento. Quest'ultima, risulta, infatti, essere la migliore combinazione fra percentuale di abbattimento di *Salmonella enteritidis* (80%) e integrità delle caratteristiche dell'uovo.

Bibliografia

1. Anonymus (2001) *Salmonella* in Humans: England and Wales (1981-1999). Public Health Laboratory Service
2. Baumler, A.J., Hargis, B.M., and Tsois, R.M. (2000) Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science* 287: 50-52
3. BEN Notiziario ISS – Vol.14 – n.11 Novembre 2001
4. Gast,R.K., and Holt, P.S., (2000) Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* in the yolk and

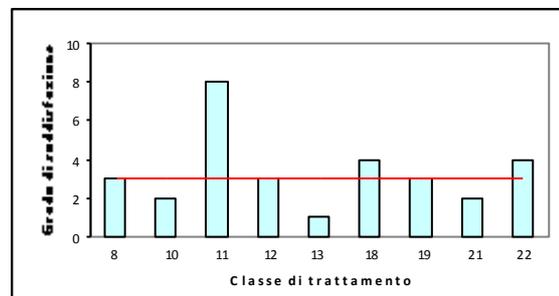
albumen of eggs laid by experimentally infected hens. *Avian.Dis* 44: 706 -710

Tabella 1. Esiti delle diverse classi di trattamento
Table 1: Results of the different classes of treatment

Classe di trattamento	N° Prove eseguite	N° Prove con eliminazione <i>Salmonella</i>	% Prove	Caratteristiche albume	Caratteristiche tuorlo	Grado di soddisfazione
1	4	0	0%	++	+/-	0
2	7	0	0%	+/-	ok	0
3	8	0	0%	+	+	0
4	4	0	0%	+/-	+	0
5	2	0	0%	ok	ok	0
6	9	0	0%	+	+	0
7	11	0	0%	ok	ok	0
8	14	4	28%	ok	ok	3
9	12	10	83%	+++	+++	0
10	18	2	11%	ok	ok	2
11	5	4	80%	ok	ok	8
12	6	4	66%	+	++	3
13	11	2	18%	+	++	1
14	10	0	0%	+/-	ok	0
15	3	0	0%	ok	ok	0
16	3	3	100%	+++	+++	0
17	3	0	0%	+	+	0
18	18	8	44%	+	+/-	4
19	16	12	75%	++	+/-	3
20	1	1	100%	+++	+++	0
21	9	4	44%	++	+	2
22	10	3	30%	+/-	ok	4
23	8	0	0%	ok	ok	0

Figura 1. Andamento della qualità nelle diverse tipologie di trattamento

Figure 1. Quality trend for the different type of treatment



COMUNICAZIONE 10

IDENTIFICAZIONE DI *HELICOBACTER* IN SPECIE AVIARI CON METODICHE BIOMOLECOLARI

C. Tramuta, S. Buttignol, E. Bert, P. Nebbia

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

Parole chiave, *Helicobacter*, galline ovaiole, Polymerase chain reaction, sequenziamento.

***Helicobacter* spp. identification in avian species using biomolecular assay**

Key Words: *Helicobacter* spp., laying hens, Polymerase chain reaction, sequencing

Summary: A PCR assay to detect *Helicobacter* spp. in avian species was carried out. The 16S rRNA gene was amplified with primers specific for members of the genera *Helicobacter*. A total of 10 laying hens were tested and 8 cecal samples resulted positive for *Helicobacter* spp. presence. Sequencing showed the bacteria to belong to the *H. pullorum* species.

Correspondence: Nebbia Patrizia, 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: patrizia.nebbia@unito.it

Introduzione

Gli *Helicobacter* spp. colonizzano lo stomaco e l'intestino dell'uomo e di molti animali, mammiferi e uccelli. Rivestono grande importanza nella medicina umana, in particolare *H. pylori* è notoriamente associato a gastriti, ulcere e tumori epatici, mentre in medicina veterinaria sono soprattutto i carnivori domestici a presentare infezione da questi microrganismi, la cui presenza è associata a patologie gastrointestinali (9). In particolare negli ultimi anni è stato oggetto di studio il potere patogeno di alcune specie di *Helicobacter* dette enteroepatiche. Simili alle specie gastriche, sono responsabili di infiammazioni croniche e neoplasie e possono colonizzare le vie biliari e il fegato (9).

Nei volatili sono state isolate fino ad oggi due specie di *Helicobacter*: *H. pametensis* (isolato da feci di uccelli selvatici) (3,8) e *H. pullorum*, isolato dai ciechi di polli, fegato e contenuto intestinale di galline ovaiole (1,10). Il potere patogeno di queste specie è tuttora sconosciuto, ma in base alle analogie con i *Campylobacter* si è ipotizzato che *H. pullorum* possa rappresentare una minaccia di zoonosi per l'uomo, essendo stato isolato in uomini con diarrea (1,4).

Alcuni fattori rendono difficoltosa la diagnosi: l'infezione è quasi sempre subclinica, l'esame batteriologico è difficile da allestire sia per le particolari esigenze culturali di questi batteri sia per la presenza della flora gastroenterica, che ostacola la crescita in purezza del germe. Per questi motivi molti studi sono stati condotti per ottenere metodi rapidi, accurati, alternativi alla coltura, per mettere in evidenza gli *Helicobacter* in individui infetti (2,5,7).

In questo studio, condotto su galline ovaiole, abbiamo messo a punto una metodica che permette di identificare, a partire da organo, differenti specie di *Helicobacter*. Si tratta di un lavoro preliminare sulla ricerca di *Helicobacter* in diverse specie animali.

Materiali e metodi

Campioni. Sono stati prelevati campioni da 10 galline ovaiole morte, provenienti da un allevamento semintensivo situato nella Provincia di Torino.

Sui soggetti veniva effettuata l'autopsia. Dal fegato e dagli intestini (ciechi e duodeno), che presentavano lesioni necrotico-emorragiche, venivano prelevati campioni per l'estrazione del DNA.

Estrazione del DNA. Veniva eseguita dai campioni di fegato, duodeno, ciechi e dal contenuto cecale. Per l'estrazione è stato usato il *Wizard genomic DNA*

purification kit[®] (Promega-USA). Sui campioni ottenuti è stata eseguita la quantificazione del DNA mediante spettrofotometro. **Controllo interno** è stata eseguita una PCR con primers universali per la 16S rRNA (5) per verificare la qualità dell'estrazione.

Amplificazione di una sequenza interna al gene rRNA 16S di *Helicobacter* genus. Per l'amplificazione sono stati utilizzati i primers pubblicati da Beckwith (2). Primer sense: CTATGACGGGTATCCGGC, primer antisense: ATTCCACCTACCTCTCCCA che amplificano una porzione di 375 paia di basi. La reazione di amplificazione avveniva alle seguenti temperature: denaturazione 94°C per 2 secondi, appaiamento 53°C per 2 secondi, allungamento 72°C per 30 secondi, per 45 cicli.

Per evidenziare gli amplificati veniva eseguita una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2,5%, con successiva colorazione in bromuro d'etidio.

Sequenziamento: cinque campioni positivi alla PCR venivano purificati con il QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen-USA) e sequenziati con ABI prism 310 Genetic Analyzer[®] (ABI-USA).

Risultati

L'estrazione del DNA dagli organi con la metodica da noi utilizzata risultava valida. Allo spettrofotometro si rilevava un quantitativo medio di DNA di 40µg/µl con un valore di purezza di 1,9 (OD260/OD280). Tutti i campioni sono risultati positivi alla PCR con i primers universali.

Sul totale delle 10 galline esaminate, 8 erano positive alla ricerca di *Helicobacter* genus.

La ricerca dell'*Helicobacter* ha dato risultati differenti secondo i campioni di partenza: nei ciechi si è potuta rilevare la maggior parte dei positivi; la metà dei campioni ottenuti dal contenuto cecale era positiva; la totalità dei campioni da duodeno e quasi tutti campioni estratti da fegato risultavano negativi (fig. 1).

Il sequenziamento dei prodotti di PCR risultati positivi alla ricerca di *Helicobacter* ha permesso di identificare gli amplificati come appartenenti alla specie *H. pullorum*, con un e-value di e-142 e un'identità del 99% alla ricerca su Blast-n (NCBI). Con gli stessi valori, l'allineamento evidenziava *H. canadensis*.

Discussione

E' risaputo che la quantità di DNA estratto dipende dal protocollo usato e dal tipo di matrice ed è possibile che a partire da campioni come feci, contenuto cecale, fegato, la presenza di inibitori infici i risultati della PCR. Abbiamo quindi eseguito un'amplificazione sul

DNA estratto dai diversi organi con i primers universali, dimostrando la presenza di DNA amplificato in tutti i campioni in esame. Questo dato è importante anche per il proseguo del nostro lavoro, in cui intendiamo ricercare *Helicobacter* spp. nelle feci di animali in vita.

Con la PCR per il genere *Helicobacter* abbiamo osservato la presenza di questo microrganismo soprattutto a livello dei ciechi, il che fa ritenere che vi sia un maggior tropismo verso quest'organo rispetto a fegato e duodeno.

Le sequenze da noi ottenute sono risultate sovrapponibili a quelle della regione 16S rRNA di *H. pullorum* e di *H. canadensis*. Poiché *H. canadensis* non risulta al momento essere mai stato isolato negli animali, ma solo nell'uomo (dati non pubblicati) abbiamo ritenuto corretto identificare le nostre sequenze come appartenenti a *H. pullorum*.

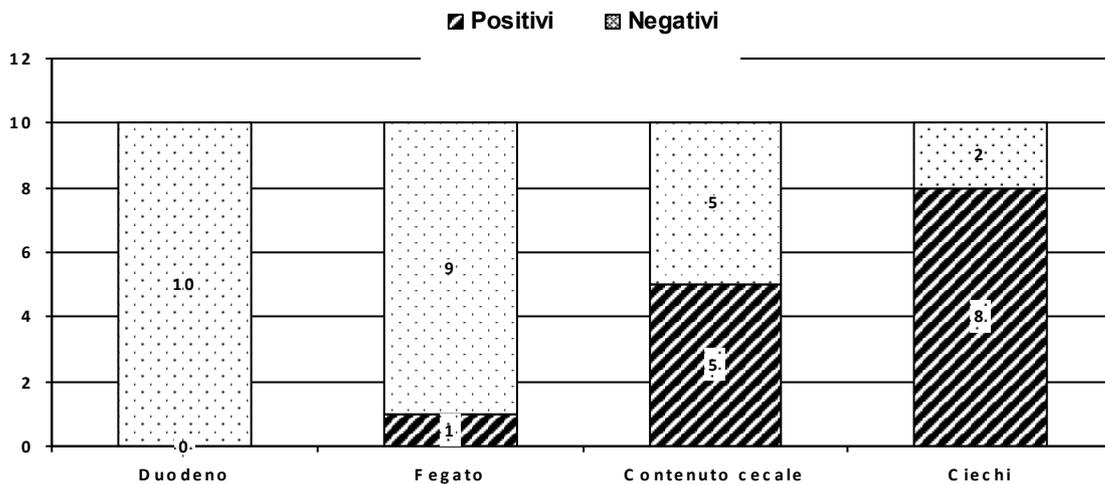
L'identificazione di una sola specie di *Helicobacter* inoltre concorda con i dati bibliografici, che vedono in *H. pullorum* il principale agente infettante nel pollo (3,4,8). La percentuale di positività (80%) a *H. pullorum* riscontrata nel nostro campione corrisponde a quella ottenuta da Atabay e collaboratori (1) a partire da carcasse di polli. Come suggerito da questi autori, riteniamo che, analogamente a quanto osservato per *Campylobacter jejuni*, *H. pullorum* dovrebbe essere maggiormente considerato quale potenziale causa di patologie gastrointestinali negli animali e nell'uomo.

In conclusione riteniamo utile proseguire questa indagine su volatili sia d'allevamento sia da compagnia per ottenere ulteriori dati sull'infezione da *H. pullorum* e per identificare eventuali altre specie di *Helicobacter*.

Bibliografia

1. Atabay, H.I., J.E. Corry, S.L. On. (1998). Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. J. Appl. Microbiol., 84: 1017-1024
2. Beckwith C.S., Franklin C.L., Hook R.R.Jr, Besch-Williford C.L., Riley L.K. (1997). Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. J. Clin. Microbiol., 35:1620-1623.
3. Dewhirst, F.E., C. Seymour, G.J. Fraser, B.J. Paster, J.G. Fox. (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 44:553-560.
4. Fox J.G., Chien C.C., Dewhirst F.E., Paster B.J., Shen Z., Melito P.L., Woodward D.L., Rodgers F.G. (2000) *Helicobacter canadensis* sp. Nov. isolated from human with diarrhea as an example of an emerging pathogen. J. Clin. Microbiol., 38:2546-2549.
5. Gramley W.A., A. Asghar, H.F. Frierson Jr, and S.M. Powell. (1999) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J. Clin. Microbiol., 37: 2236-2240
6. Park C.S., J. Kim. (1999). Rapid and easy detection of *Helicobacter pylori* by in situ hybridization. J. Korean Med. Sci., 14: 15-20
7. Seymour C., Lewis R.G., Kim M., Gagnon D.F., Fox J.G., Dewhirst F.E., Paster B.J. (1994). Isolation of *Helicobacter* strains from wild bird and swine feces. Appl. Environ. Microbiol., 60:1025-1028.
8. Solnick J.V., Schauer D.B. (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin. Microbiol. Rev., 14:59-97.
9. Stanley J., Linton D., Burnens A.P., Dewhirst F.E., On S.L., Porter A., Owen R.J., Costas M. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov.- genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. Microbiology, 140:3441-3449.

Figure 1. Presenza di *H. pullorum* nei diversi organi
Figure 1: presence of *H. pullorum* on different organs



COMUNICAZIONE 11

PCR NELLA DIAGNOSI IN VIVO DELL'INFEZIONE DA CIRCOVIRUS NEL PICCIONE

M.P. Franciosini, E. Fringuelli, O. Tharuni, G. Guelfi, G. Asdrubali

Dipartimento di Scienze Biopatologiche veterinarie. Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia

Parole chiave: circovirus, piccione, PCR, sangue, contenuto intestinale

A PCR based method to detect Pigeon circovirus infection in vivo

Key words: Circovirus, pigeons, PCR, blood, intestinal content

Summary: It is here described a standard PCR protocol for the in vivo diagnosis of pigeon circovirus. Samples of sera and intestinal contents of pigeons belonging to different age groups, all originating from a intensive unit located in Centre Italy were examined. For running the PCR method we used a couple of primers that amplifies a segment of 518 bp. By carrying out this method we found positive 15 sera samples and 12 intestinal contents, out of 100 globally examined. For a routine use of PCR it is suggested the use of universal primers set up after having compared the sequence of a number of strains isolated from geographically different areas.

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

Introduzione

La diagnosi di infezione da Circovirus nel piccione risulta problematica dal momento che non è possibile la coltivazione del virus e non sono disponibili antisieri specifici per la ricerca dell'antigene; pertanto l'esame istologico e l'indagine alla M.E a contrasto negativo fino ad ora sono state le procedure diagnostiche più applicate (4,1). Il recente clonaggio e la determinazione della sequenza nucleotidica del genoma di PiCV (5) ha comportato lo sviluppo di nuovi strumenti per la diagnosi di infezione da Circovirus nei piccioni, quali il test di PCR e di DBH (test di ibridazione dot blot) (6). La maggior parte delle procedure descritte si riferisce ad indagini condotte post mortem; solo recentemente, infatti, Hatterman et al. (3) hanno messo a punto un test di DBH, eseguito su campioni di sangue, che consente una diagnosi in vivo delle infezioni da Circovirus.

L'obiettivo principale di tale lavoro è stato quello di eseguire il test di PCR a partire da campioni costituiti da sangue e da contenuto intestinale, al fine di poter valutare la possibile applicazione di questa procedura per indagini diagnostiche ed epidemiologiche.

Materiali e Metodi

Le ricerche sono state condotte su 100 piccioni, di età compresa tra 1 settimana e 42 gg, prelevati a random da un allevamento del Centro Italia. Previo salasso, i soggetti sono stati soppressi, sottoposti ad esame necroscopico e sono stati raccolti il contenuto intestinale, timo e borsa di Fabrizio. Per il test di PCR, il contenuto intestinale e il sangue sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso, mentre borsa di Fabrizio e timo sono stati fissati in formalina per indagini istologiche. Il DNA è stato estratto da tutti i campioni utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit e il QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen) seguendo il protocollo standard.

Per la reazione di PCR è stata usata una coppia di primer che amplifica un segmento di 518 bp localizzato nella regione genomica all'estremità 3' degli ORF V1 e C1 del virus (primer senso: 5'-CGT GCG TGA TAA TAG TG-3'. Primer antisense: 5'-TGT ATT ATG AAT GTG AAG TGA CC3') (6). Il DNA estratto è stato sottoposto ad amplificazione genica utilizzando la PCR Master Mix (MBI Fermentas). Il protocollo di PCR comprende i seguenti cicli: una fase

di predenaturazione a 94°C per 1' 30" e 35 cicli a 94°C per 15", 60°C per 30" e 72°C per 45" con una estensione finale a 72°C per 10'. Oltre al controllo negativo, è stato effettuato un controllo positivo con DNA plasmidico ricombinante contenente il genoma del circovirus (isolato 9030) ed un controllo per monitorare il DNA di partenza mediante housekeeping 18S, bp315 (Fig.1 e 2). L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante applicazione del test χ^2 .

Risultati

Le lesioni macro e microscopiche a carico degli organi linfatici primari, caratterizzate rispettivamente da atrofia e deplezione linfocitaria, aumentano in modo significativo ($P<0,001$) con l'età fino ad arrivare al 100% nei soggetti da rimonta esaminati in VI settimana (tab.1). In IV settimana si osserva una positività del 30% per quanto riguarda il sangue e del 20% per il contenuto intestinale, mentre relativamente ai piccioni di 6 settimane la percentuale di soggetti positivi è pari al 40% per il sangue e al 30% per il contenuto intestinale (tab.2) Il test del χ^2 non evidenzia differenze significative fra i campioni all'interno della medesima settimana. Lo stesso test, inoltre, evidenzia un significativo aumento di positività nel tempo dei campioni saggiati ($P<0,01$ per il sangue e $P<0,02$ per il contenuto intestinale).

Considerazioni e conclusioni

Come riscontrato nel corso di precedenti studi (2) le lesioni macro e microscopiche prodotte dall'azione del circovirus aumentano con l'età, giustificando una trasmissione a carattere prevalentemente orizzontale. Nella maggior parte dei casi non sono stati osservati sintomi a conferma del fatto che l'infezione è spesso subclinica (4); a volte sono state riscontrate lesioni anatomopatologiche riportabili all'azione di *Salmonella spp.*, *E.coli* e *Trichomonas*. L'osservazione microscopica delle sezioni di timo e borsa di Fabrizio non ha permesso di rilevare le caratteristiche inclusioni basofile citoplasmatiche anche in presenza di marcata deplezione linfocitaria, osservabili generalmente in stati avanzati dell'infezione. L'assenza sempre più frequente di questo reperto istopatologico potrebbe essere giustificata dall'intervento di varianti del PiCV caratterizzate da una azione patogena diversa (6). I risultati ottenuti relativi al test di PCR consentono di trarre alcune

considerazioni; in primo luogo va sottolineato che la positività dei campioni aumenta in modo statisticamente significativo con l'età. Inoltre, tale metodica, eseguita su campioni di sangue, ha evidenziato la sua possibile applicazione a scopo diagnostico nell'animale in vita. La presenza del virus nel contenuto intestinale, in particolare in soggetti di età superiore alla IV settimana, conferma ulteriormente una trasmissione per contatto diretto, in cui le feci nelle voliere potrebbero giocare un ruolo di primaria importanza e costituire un potenziale materiale di ricerca del virus tramite PCR. E' evidente tuttavia che, nonostante l'estrema sensibilità e specificità che caratterizza questa procedura, alcuni campioni provenienti da soggetti con marcata deplezione linfocitaria sono risultati negativi. Ciò conferma il fatto che un limite all'applicazione del test di PCR, come strumento di screening epidemiologico, potrebbe essere costituito dall'esistenza di varianti di PiCV (6). Pertanto i risultati negativi ottenuti in alcuni casi possono essere dovuti al set di primer utilizzato. Di conseguenza l'impiego del test di PCR per la diagnostica e l'epidemiologia delle infezioni da Circovirus risulta sicuramente subordinato ad un sequenziamento dei virus isolati da differenti aree geografiche, al fine di individuare una regione conservata del virus ove disegnare primer universali

che consentano l'applicazione di tale metodica su larga scala.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. D. Todd, Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, Veterinary Sciences Division, per il plasmide ricombinante (isolato 9030) fornito.

Bibliografia

1. 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 Dis.* 44, 454-459
2. Franciosini M.P., Lavazza A., Parillo F., Tacconi G. 2002. Risultati preliminari su alcuni aspetti patogenetici dell'infezione da Circovirus nei piccioni da carne. *L.An.Pev.* 6 83-84
3. Hatterman K., Soike D., Grund C., Mankertz A. 2002. A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *J. Virol. Meth.* 104, 55-58
4. Pare J.A., Brash M.L., Hunter B., Hampson R.J. 1999. Observations on pigeon circovirus infection in ontario. *Can. Vet. J.* 40:659-662
5. Todd D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286, 354-362
6. Todd D., Duchatel J.P., Weston J.H., Ball N.W., Borghmans B.J., Moffett D.A., Smyth J.A. 2002. Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation tests in the diagnosis of pigeon circovirus infection *Vet.Micr.* 89, 1-16

Tabella 1. Lesioni anatomiche e istologiche del timo e della borsa di Fabrizio riscontrate nelle varie fasce di età
Table 1. Anatomical and histological lesions of thymus and bursa of Fabricius in pigeons of different age

	I settimana		II settimana		III settimana		IV settimana		VI settimana	
	Timo	Borsa	Timo	Borsa	Timo	Borsa	Timo	Borsa	Timo	Borsa
Lesioni anatomiche (%)	0/20	0/20	2/20	2/20	9/20	12/20	18/20	12/20	20/20	20/20
	-	-	(10%)	(10%)	(45%)	(60%)	(90%)	(60%)	(100%)	(100%)
Lesioni istologiche (%)	0/20	0/20	2/20	2/20	8/20	12/20	10/20	12/20	20/20	20/20
	-	-	(10%)	(10%)	(40%)	(60%)	(50%)	(60%)	(100%)	(100%)

Tabella 2. Campioni di sangue e di contenuto intestinale, prelevati da soggetti di varie fasce di età, risultati positivi al test di PCR.

Table 2. PiCV-DNA detection by PCR in blood and intestinal samples from pigeons of different age

	I settimana		II settimana		III settimana		IV settimana		VI settimana	
	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.
PCR (%)	1/20	1/20	0/20	0/20	0/20	1/20	6/20	4/20	8/20	6/20
	(5%)	(5%)	-	-	-	(5%)	(30%)	(20%)	(40%)	(30%)

Figura 1. PCR per il rilievo di PiCV. Lane 1 controllo negativo di PCR, lane 2 Ladder 100bp, lane 3 controllo positivo, lane 4-5-6 campioni negativi di sangue

Figure 1. PiCV-specific PCR. Lane 1 PCR negative control, lane 2 Ladder 100bp, lane 3 positive control, lane 4, 5, 6 negative blood samples

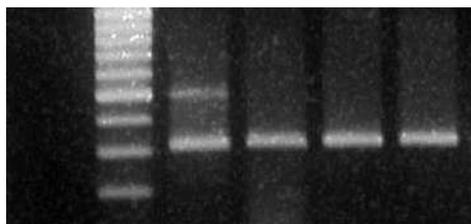
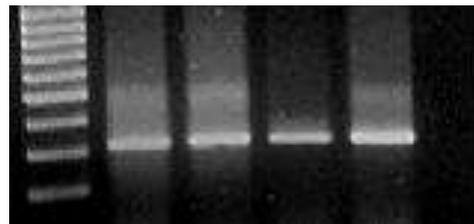


Figura 2. PCR per il rilievo di PiCV. Lane 1 Ladder 100bp, lane 2-3 campioni positivi sangue, lane 4 campione negativo sangue, lane 5 campione positivo feci, lane 6 controllo negativo di PCR

Figure 2. PiCV-specific PCR. Lane 1 Ladder 100bp, lane 2-3 positive blood samples, lane 4 negative blood samples, lane 5 positive intestinal sample, lane 6 PCR negative control.



COMUNICAZIONE 12

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA E DELL'INNOCUITA' DELLA VACCINAZIONE PER IL VAIOLO NEL CANARINO (*SERINUS CANARIUS*)

C. Terregino¹, I. Capua¹, F. Mutinelli², A. Toffan¹

¹Laboratorio di Virologia, ²Laboratorio di Istopatologia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

Parole chiave: canarino, vaiolo aviario, vaccinazione, efficacia, sicurezza

Evaluation of efficacy and security of live vaccine for canary-poxvirus

Key words: canary, avian pox, vaccination, efficacy, safety

Summary: Avian pox is one of the most important disease in canary. In this species is very common the septicemic form of the disease and birds of any age are susceptible. The mortality rates in the flock usually is very high. Canary pox infections can be prevented by using a specific commercially available attenuated-live vaccine. In the present paper the vaccine Poulvac® Canary pox (Fort Dodge) was tested in order to assess its efficacy and safety. The data obtained show that the vaccine is safe and able to prevent the disease in the challenged birds.

Correspondence: Calogero Terregino, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD) e-mail virologia@izsvenezie.it

Introduzione

Uno dei problemi infettivi più gravi per l'allevamento del canarino è rappresentato dal diftero-vaiolo aviario. E' una malattia ampiamente distribuita in tutto il mondo causata da *Avipox* appartenenti alla sottofamiglia delle *Chordopoxvirinae* e alla famiglia dei *Poxviridae*. Nel genere *Avipox* sono comprese attualmente almeno 10 specie di virus ben definite identificate soprattutto dalla specie ospite, più altre in via di classificazione. Ci sono almeno 4 specie di virus del diftero-vaiolo che interessano le specie domestiche: ceppo pollo, ceppo tacchino, ceppo piccione e ceppo canarino, mentre ci sono molti altri *Avipoxvirus* in grado di infettare numerose altre specie di volatili. Più precisamente sono state segnalate infezioni spontanee in più di 60 specie appartenenti a 20 famiglie. Recentemente sono stati segnalati casi di diftero-vaiolo aviario in 209 specie di uccelli domestici e selvatici appartenenti a 22 ordini diversi, si ritiene comunque che tutti i volatili siano sensibili alla malattia (1). Il vaiolo nel canarino è stato segnalato per la prima volta nel 1930. La malattia in questa specie è sostenuta da un *Avipoxvirus* specifico indicato appunto come poxvirus del canarino o *canary-poxvirus*. I canarini sono, infatti, molto sensibili ai poxvirus del canarino ma sono resistenti a quelli del pollo, del tacchino e del colombo. Studi di cross-neutralizzazione indicano che il poxvirus del canarino è antigenicamente correlato a quello del pollo, tuttavia il *canary-poxvirus* è in grado di provocare solo lievi lesioni cutanee in polli e tacchini infettati sperimentalmente (4). La caratterizzazione del genoma mediante l'analisi delle endonucleasi di restrizione ha inoltre permesso di evidenziare che il poxvirus del canarino presenta spiccate differenze rispetto al poxvirus del pollo. Il vaiolo può essere considerato ormai una malattia endemica negli allevamenti di canarini dove ogni anno colpisce soggetti di ogni classe di età con gravi perdite. La mancanza di un vaccino specifico ha, infatti, reso la popolazione di canarini totalmente scoperta da un punto di vista immunitario, per cui si assiste a tutt'oggi ad una forte diffusione di questa patologia virale nelle sue diverse forme. La trasmissione può avvenire in maniera diretta o indiretta. Quest'ultima è mediata da artropodi vettori (principalmente zanzare) e pertanto si hanno incrementi di focolai in estate ed in zone dove

tali vettori sono particolarmente numerosi. Nel canarino il vaiolo si presenta in tre forme: la forma cutanea caratterizzata dalle tipiche lesioni vaiolose particolarmente evidenti nelle aree sprovviste di penne (palpebre, commessura del becco, zampe), la forma differica dove si osservano pseudomembrane biancastre sulla mucosa orale, sulla lingua, sulla volta del palato e sulla rima laringea e la forma generalizzata. Questa è una forma che colpisce frequentemente i canarini, nei quali si osserva polmonite desquamante con occlusione dei capillari aerei e fenomeni degenerativi epatici (2). Per la profilassi di tale malattia è importante porre in atto tutte le misure idonee ad evitare l'ingresso di portatori (passeriformi selvatici) o insetti vettori in allevamento. Tuttavia, se applicata correttamente e con presidi immunizzanti sicuri ed efficaci, la vaccinazione rimane l'arma di profilassi più efficace. Scopo della presente sperimentazione è stato quello di valutare l'efficacia e la sicurezza del Poulvac® Canary Pox al fine di permetterne la registrazione in Italia. Il Poulvac® Canary Pox è un vaccino vivo liofilizzato indicato per l'immunizzazione dei canarini (*Serinus canarius*) contro l'infezione sostenuta dal virus del vaiolo del canarino (*canary-poxvirus*).

Materiali e metodi

Sia per la sicurezza, sia per l'efficacia sono state seguite le linee guida della Farmacopea Europea (3) (F.E.).

Valutazione dell'efficacia La protezione data dalla vaccinazione con il Poulvac® Canary Pox è stata valutata mediante *challenge* con virus del vaiolo del canarino (*canary-pox*) altamente patogeno. Il ceppo utilizzato, BS L.69, è stato fornito dalla Sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Sono stati utilizzati trenta canarini, venti di questi soggetti sono stati sottoposti a vaccinazione secondo la modalità raccomandata dalla ditta produttrice del vaccino, ossia tramite puntura a livello della superficie inferiore della plica alare, mentre altri dieci hanno formato il gruppo di controllo. Ventuno giorni dopo la vaccinazione tutti i canarini sono stati infettati per via follicolare, a livello della cute del dorso, con il virus patogeno. I canarini sono stati sottoposti a visita clinica quotidiana. Gli

animali sono stati tenuti sotto osservazione per ventuno giorni dopo il *challenge*, i soggetti deceduti sono stati sottoposti ad esame necroscopico durante il quale sono stati prelevati campioni d'organi (cute, fegato, polmoni) per gli esami istologici e virologici.

Valutazione della sicurezza

Secondo la F.E. la sicurezza nella somministrazione di un sovradosaggio va eseguita con una dose vaccinale dieci volte superiore a quella normalmente utilizzata. Sono stati utilizzati per il test 10 canarini. Per la vaccinazione si è proceduto in questo modo:

- Ricostituzione del vaccino (flacone da 50 dosi + 0,5 ml di diluente) con 1/5 di diluente (100 µl) in modo da ottenere una sospensione virale 5 volte più concentrata di quella d'uso.
- Somministrazione di tale sospensione virale in entrambe le pliche alari (vaccinazione doppia)

La valutazione clinica delle lesioni è stata effettuata a 7, 15 e 21 giorni post-infezione (p.i.). Il test viene giudicato valido se nessuno dei canarini vaccinati mostra sintomi clinici o lesioni riferibili a vaiolo aviare (lesioni cutanee o membrane differiche a livello della mucosa del cavo orale e delle prime vie respiratorie) o muore per cause attribuibili all'infezione da virus vaccinale.

Valutazione del rischio di rivirulentazione nel canarino e nel pollo (*Gallus gallus*)

In questa fase è stato somministrato il vaccino per puntura alare ad un primo gruppo di 5 canarini e a 2 gruppi di 5 polli *White Leghorn* di 10 e 30 giorni d'età e si è atteso il formarsi della lesione nel sito di inoculo (indice dell'attecchimento del virus, in genere dopo 7 giorni le lesioni sono ben evidenti). È stato quindi fatto un pool delle lesioni cutanee dei 5 soggetti che sono state omogenate e risospese in 1 ml di soluzione salina tamponata (PBS) antibiotata. Tale sospensione è stata inoculata mediante puntura alare in altri 5 canarini e 5 polli della stessa età in modo da permettere al virus di replicarsi nuovamente in altri ospiti recettivi e provocare nel punto di inoculo lesioni simili a quelle viste nel passaggio precedente. Sono stati quindi eseguiti 5 passaggi e ad ogni passaggio si è verificato la presenza di lesioni attribuibili ad infezione vaiolosa. Il test si considera superato nel caso in cui non si ha un incremento della virulenza del virus vaccinale e le lesioni osservate al 5° passaggio sono simili a quelle osservate al 1° passaggio.

Risultati

Efficacia

Nel gruppo non vaccinato, i primi sintomi costituiti da arruffamento delle piume e riluttanza al movimento, sono comparsi in quinta giornata post-infezione (p.i.) e sono andati via via aggravandosi. Tutti i soggetti del gruppo di controllo sono deceduti tra il decimo e l'undicesimo giorno p.i.. All'esame necroscopico sono state riscontrate le seguenti lesioni: spesse escare cutanee nel punto d'inoculo del virus patogeno, epatomegalia, congestione polmonare. L'esame istologico di campioni di cute, fegato e polmone ha confermato la presenza di gravi lesioni in questi organi, in particolare istologicamente è stata osservata dermatite necrotica, necrosi epatica a focolai multipli e flogosi e congestione polmonare. Campioni degli stessi organi, opportunamente trattati, sono stati sottoposti all'esame virologico in uova embrionate di pollo SPF di 10 giorni d'incubazione inoculate sulla membrana corion-allantoidea. Il virus utilizzato nel

challenge è stato isolato al primo passaggio da tutti e tre gli organi prelevati. Nel gruppo vaccinato tutti i canarini sono apparsi in buone condizioni di salute, eccettuato alcuni soggetti che per 3-4 giorni hanno presentato lievi segni di malessere generale. Terminato il *challenge* (21 giorni p.i.) tutti i canarini non vaccinati sono deceduti mentre nessuno dei soggetti vaccinati è deceduto o ha mostrato sintomi riferibili ad infezione sistemica o localizzata da virus del vaiolo.

Sicurezza

Dopo la doppia somministrazione della sospensione di virus del vaccino concentrato (5 x) gli animali sono stati tenuti sotto osservazione per 21 giorni. Gli animali sono apparsi per tutta la durata della prova in buone condizioni di salute. Le lesioni nel sito d'inoculo al settimo, quattordicesimo e ventunesimo giorno dopo la vaccinazione sono state del tutto analoghe a quelle viste dopo vaccinazione standard. Nessuno dei soggetti vaccinati è deceduto o ha mostrato sintomi riferibili ad infezione sistemica o localizzata da virus del vaiolo.

Rischio di rivirulentazione nel canarino e nel pollo

I 5 passaggi effettuati non hanno evidenziato alcun segno di rivirulentazione del virus né nel canarino né nel pollo, infatti le lesioni al punto di inoculo sono andate via via riducendosi fino quasi a scomparire progressivamente nelle ultime repliche. La prova è stata ripetuta per una seconda volta partendo nuovamente dalla vaccinazione con dose standard. L'andamento della ripetizione è stato analogo alla prima volta.

Discussione

Il Poulvac® Canary Pox ha dimostrato di essere molto efficace nel proteggere gli animali dall'infezione con virus altamente patogeno e quindi evitare l'insorgenza della malattia clinicamente manifesta. Dopo il *challenge* in nessuno degli animali vaccinati si sono osservati sintomi o lesioni attribuibili a diftero-vaiolo.

Il virus presente nel vaccino, pur mantenendo intatta la capacità di immunizzare efficacemente gli animali, ha perso ogni patogenicità residua, sia quando somministrato secondo le modalità consigliate dalla ditta produttrice, sia quando somministrato più concentrato. Inoltre le prove sulla reversione alla virulenza hanno dimostrato che il virus vaccinale è dotato di elevata stabilità. La scarsa capacità di replicarsi in ospiti diversi dal canarino trova conferma nelle prove di vaccinazione effettuate nel pollo, anche in soggetti molto giovani di pochi giorni di vita, a dimostrazione della natura specie-specifica del virus del vaiolo del canarino e dei poxvirus in generale.

Considerando tali dati riteniamo giustificato concludere che il Poulvac® Canary Pox, impiegato come indicato nelle istruzioni per l'uso e nella specie alla quale è destinato, può essere ritenuto un presidio immunizzante efficace e sicuro.

Bibliografia

1. Branson W. Ritchie (1995) Poxviridae in Avian Viruses Wings Publishing Inc. Lake Worth Florida 285-311.
2. Kirnse P. (1969) Host specificity and pathogenicity of poxviruses from wild birds. Bull. Wild. Dis. Assoc. 5, 376-386.
3. Farmacopea Europea - 3ª Edizione.
4. Macwhirter P. (1994) Passeriformes. In Clinical Avian Medicine and Surgery. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1173-1199.

COMUNICAZIONE 13

RIDUZIONE DELLA SENSIBILITA' DI TACCHINI VACCINATI ALL'INFEZIONE SPERIMENTALE CON VIRUS INFLUENZALE H7N3 A BASSA PATOGENICITA'

C. Terregino¹, G. Cattoli¹, A. Toffan¹, M. Mancin², I. Capua¹

¹Centro di Referenza Nazionale ed OIE per la malattia di Newcastle e l'Influenza aviaria – ²Centro Regionale Epidemiologia Veterinaria del Veneto Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD)

Parole chiave: influenza aviaria, riduzione sensibilità, vaccinazione eterologa

Reduced susceptibility of vaccinated turkey to experimental infection with an H7N3 LPAI virus

Key words: avian influenza, susceptibility, heterologous vaccination

Summary: A trial was performed to establish whether turkeys vaccinated against avian influenza with a vaccine containing a strain with a heterologous neuraminidase to the challenge virus, required a higher infectious dose to develop infection than naïve birds. Birds were vaccinated with a commercially available, inactivated oil emulsion product containing the A/ty/Italy/99/H7N1 strain and challenged with different dilutions of a LPAI isolate of the H7N3 subtype (A/ty/Italy/8000/02) obtained during the 2002-2003 Italian epidemic. Groups of 10 vaccinated and 10 unvaccinated birds were experimentally infected with a virus suspension containing 10^2 , 10^4 , 10^5 EID 50/100 μ l. Infected birds were observed daily with tracheal and cloacal swabs collected at regular intervals for antigen detection, virus isolation and real-time PCR (RRT-PCR). Pre and post infection serology was also performed. The results of the experiment indicate that infection is achieved in naïve birds with 10^4 EID 50, while vaccinated birds are resistant at this challenge dose. Vaccinated and unvaccinated birds were susceptible to infection with 10^5 , although the duration and/or the number of birds shedding was reduced in the vaccinated group. The data presented indicate that heterologous vaccination in the framework of a "DIVA" strategy can be a valid tool to support eradication measures in areas with high densities of susceptible animals.

Correspondence: Ilaria Capua, IZS delle Venezie, viale dell'Università, 10 – 35020 Legnaro (PD); email: icapua@izsvenezie.it

Introduzione

I virus dell'influenza aviaria (AIV) appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae*, tipo A e possono essere classificati in base alle caratteristiche di patogenicità in virus a bassa patogenicità (LPAI) ed in virus ad alta patogenicità (HPAI). Come per le altre malattie della lista A dell'OIE la vaccinazione per HPAI è vietata nei paesi dell'Unione Europea onde evitare l'interferenza con i piani di siero-sorveglianza ed eradicazione. L'uso di vaccini marker, che permettono di distinguere gli animali infetti dai vaccinati, può rappresentare invece un valido strumento di lotta nel controllo di epidemie da LPAI da affiancare alle misure di biosicurezza (1). Non esistono tuttavia dati che dimostrino se la vaccinazione rende gli animali meno sensibili all'infezione. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di stabilire il livello di sensibilità e l'entità dell'eliminazione virale in tacchini vaccinati con vaccino eterologo e sottoposti a *challenge* con virus LPAI.

Materiali e metodi

Animali utilizzati per la prova. 60 tacchine commerciali divise in modo *random* in due gruppi da 30. Un gruppo vaccinato secondo lo schema descritto di seguito ed un gruppo utilizzato come controllo. Ogni gruppo è stato ulteriormente diviso in tre sottogruppi di 10 soggetti ciascuno. Gli animali sono stati allevati a partire dal primo giorno di vita negli isolatori degli stabulari dell'IZS delle Venezie e saggiati con esito negativo alla prova di AGID per la ricerca di anticorpi anti-nucleoproteina prima della vaccinazione.

Vaccino. Vaccino spento in adiuvante oleoso (ceppo A/turkey/Italy/99/H7N1), somministrato secondo il protocollo approvato dalla Commissione Europea (Decisione della Commissione 2002/979/EC). I tacchini sono stati vaccinati ad 8 e 30 giorni di età con 0,25 ml e a 50 giorni con 0,5 ml di vaccino.

Virus di challenge. Virus influenzale, tipo A, sottotipo H7N3 (A/turkey/Italy/02). La EID₅₀ è stata calcolata con la formula di Reed e Muench in uova SPF.

Protocollo sperimentale. I tre gruppi di animali

vaccinati ed i tre gruppi di animali di controllo sono stati infettati rispettivamente con tre differenti sospensioni virali contenenti 10^2 , 10^4 e 10^6 EID₅₀/100 μ l 21 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Ciascun animale ha ricevuto 100 μ l di sospensione virale per via nasale. Gli animali sono stati sottoposti a visita clinica quotidiana. Al giorno 3, 5, 7, 10, 12, 15 e 20 post-infezione (p.i.) sono stati effettuati su ogni animale tamponi tracheali per la ricerca dell'antigene (ELISA), l'isolamento virale e la ricerca del genoma virale (RRT-PCR). Pool di 10 tamponi sono stati stemperati in 1 ml di PBS sterile. Tamponi cloacali sono stati eseguiti al giorno 3, 5, 7, 10, 12, 15 e 20 p.i. per l'isolamento virale e la ricerca del genoma virale (RRT-PCR). Prima del *challenge*, a 71 giorni di vita, i sieri degli animali sono stati testati mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) per valutare il titolo degli anticorpi verso il sottotipo H7.

Test sierologici e virologici. Gli esami sierologici (HI ed AGID) e virologici in uova embrionale di pollo SPF sono stati condotti secondo quanto previsto dalla Direttiva Europea 92/40/EEC.

Ricerca dell'antigene virale. E' stato utilizzato un kit commerciale (DirectigenTM, Becton Dickinson) per la ricerca dell'antigene da tamponi tracheali.

RRT-PCR. 200 μ l di sospensione virale in PBS sono stati utilizzati per l'estrazione dell'RNA utilizzando un kit commerciale (High PureTM RNA extraction kit, Roche). 30 μ l di RNA sono stati retrotrascritti con esameri random in un volume finale di 60 μ l. Sono stati utilizzati per la PCR *primers* specifici per il gene M di AIV tipo A (4) alla concentrazione di 300 nM, cDNA è stato amplificato in un volume finale di 25 μ l utilizzando Sybr[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). La PCR è stata effettuata in ABI Prism 7700 SDS. Dopo i cicli di PCR è stata creata una curva di denaturazione al fine di distinguere le amplificazioni specifiche da quelle aspecifiche.

Analisi statistica. I titoli sierologici pre e post-*challenge* sono stati sottoposti ad analisi statistica con il test di Wilcoxon-Mann-Whitney (6) e con il test non

parametrico di Wilcoxon (3).

Risultati

In nessun animale vaccinato sono stati osservati sintomi riferibili a LPAl. Dei controlli, 5/10 animali infettati con 10^4 EID₅₀/100 µl hanno mostrato a partire dal 4° giorno p.i. depressione, diarrea e lievi disturbi respiratori. Tre tacchini infettati con 10^6 EID₅₀/100 µl hanno mostrato anche una sinusite evidenziata da lieve rigonfiamento dei seni infraorbitali. Tutti i sintomi sono scomparsi spontaneamente durante il periodo di osservazione p.i.. I risultati degli esami di laboratorio sono riassunti nelle tabelle 1 e 2. Nessun segno d'infezione è stato evidenziato nei gruppi infettati con 10^2 EID₅₀/100 µl. I dati relativi agli esami sierologici e allo *shedding* virale dimostrano una infezione attiva nel gruppo non vaccinato infettato con 10^4 EID₅₀/100 µl. Nel gruppo vaccinato ed infettato con 10^4 EID₅₀/100 µl non è stata invece osservata sieroconversione o *shedding*. Entrambi i gruppi (vaccinati e controllo) infettati con 10^6 EID₅₀/100 µl si sono infettati. Tuttavia nel gruppo vaccinato è stata registrata una riduzione della durata dello *shedding* e del numero di animali che eliminano il virus. L'analisi statistica condotta sui dati degli esami sierologici mostra una differenza significativa ($p < 0,05$) tra il gruppo infettato con 10^6 EID₅₀/100 µl e gli altri gruppi e tra i titoli dello stesso gruppo rilevati prima e dopo il *challenge* segno di infezione virale attiva. E' stata inoltre osservata una prevedibile discrepanza tra i dati ottenuti con i tre differenti test utilizzati (ELISA, RRT-PCR ed isolamento virale).

Discussione

Tabella 1. Risultati degli esami sui tamponi tracheali.

Table 1. Results of assays of tracheal swabs

EID ₅₀	Gruppi	3 gg.	5 gg.	7 gg.	10 gg.	12 gg.	15 gg.	20 gg.
		p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.	p.i.
RRT-PCR								
10^2 EID ₅₀	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10^4 EID ₅₀	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	+	+	neg.
10^6 EID ₅₀	Vacc.	+	+	+	+	+	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	+	+	neg.
ELISA								
10^2 EID ₅₀	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10^4 EID ₅₀	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	+	+	neg.	neg.	neg.
10^6 EID ₅₀	Vacc.	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	+	+	neg.	neg.	neg.	neg.
Isolamento virale								
10^2 EID ₅₀	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10^4 EID ₅₀	Vacc.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	neg.	neg.	neg.
10^6 EID ₅₀	Vacc.	+	+	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	Non vacc.	+	+	+	+	neg.	neg.	neg.

I dati presentati dimostrano che l'infezione sperimentale è stata ottenuta con dosi \geq a 10^4 EID₅₀/100 µl negli animali non vaccinati e solo con la dose 10^6 EID₅₀/100 µl nei soggetti vaccinati. Nel gruppo vaccinato è stata evidenziata con tutti e tre i test utilizzati una riduzione della durata dello *shedding* e del numero di animali che eliminano il virus per via oro-nasale. Un risultato analogo è stato ottenuto dai tamponi cloacali processati per l'isolamento virale ma non confermato dai test in RRT-PCR dai quali emerge una positività fino al 20° giorno p.i.. Considerando l'isolamento virale come "gold standard" l'ELISA appare molto meno sensibile mentre la RRT-PCR più sensibile.

Da questi dati emerge quindi che l'uso della vaccinazione può rappresentare un valido mezzo da affiancare alle misure di eradicazione messe in atto nell'epidemie da AIV. In aggiunta al noto effetto di riduzione dello *shedding* virale (5) si aggiunge pertanto una maggior resistenza all'infezione. La combinazione di questi due effetti può risultare particolarmente utile soprattutto nelle aree densamente popolate. Tuttavia, se il livello di contaminazione ambientale rimane elevato la profilassi vaccinale non riesce ad impedire l'infezione. La vaccinazione può quindi essere considerata solo uno strumento in grado di ottimizzare gli effetti delle misure restrittive e di biosicurezza messe in atto per limitare l'introduzione e la diffusione dell'infezione nelle popolazioni avicole domestiche.

Bibliografia

1. Capua, I., Terregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F. & Rodriguez, J.F. (2003). Development of a DIVA-Differentiating infected from vaccinated animals- strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathology*, 32,47-55.
2. CEC. (1992) Council Directive 92/40/EEC of 19 May 1992. *Official Journal of the European Commission*, L 167:1-15.
3. Siegel S. Castellan J. (1992). *Non parametric statistics for the Behavioural Sciences*. Mac Graw- Hill, New York, USA.
4. Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga L.L., Garber, L.P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L.T. & Suarez D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR Assay for type A Influenza Virus and the avian H5 and H7 hemagglutin in subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 3256-3260.
5. Swayne, D.E. & Suarez, D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique OIE*, 20, 463-482.
6. Thrusfield M. (1995). *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, pp. 267-272.

Tabella 2. Risultati delle prove d'isolamento virale e di RRT-PCR dai tamponi cloacali.

Table 2. Results of virus isolation and viral genome detection (RRT-PCR) assays from cloacal swabs.

EID ₅₀	Gruppi	Isolamento virale							RRT-PCR							
		3 gg. p.i.	5 gg. p.i.	7 gg. p.i.	10 gg. p.i.	15 gg. p.i.	20 gg. p.i.	Totale campioni positivi	3 gg. p.i.	5 gg. p.i.	7 gg. p.i.	10 gg. p.i.	15 gg. p.i.	20 gg. p.i.	Tot. n.° RNA pos.i	
10^2 EID ₅₀	Vaccinati	0/10*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Non vaccinati	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
10^4 EID ₅₀	Vaccinati	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	
	Non vaccinati	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	2/10	3/10	1/10	0/10	0/10	6/60	
10^6 EID ₅₀	Vaccinati	0/10	4/10	4/10	2/10	1/10	0/10	11/60	0/10	3/10	3/10	2/10	3/10	2/10	13/60	
	Non vaccinati	0/10	5/10	6/10	3/10	1/10	0/10	16/60	0/10	5/10	9/10	4/10	2/10	1/10	21/60	

* N°. di tacchini positivi/n° di tacchini del gruppo (al giorno). *Number of turkeys positive/number of turkeys in the group (per day)

COMUNICAZIONE 14

DIAGNOSI DI LABORATORIO DEL *CAMPYLOBACTER SPP.*: CONFRONTO CRITICO TRA TRE DIFFERENTI TECNICHE

L. Fiorentini, F. Paganelli, R. Leonelli

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

Parole chiave: *Campylobacter spp.*, diagnosi, multiplex-PCR, esame colturale, ELFA

Detection of *Campylobacter spp.*: critical comparison among three differens diagnostic methods

Key words: *Campylobacter spp.*, diagnosis, multiplex-PCR, microbiological test, ELFA

Summary. *Campylobacter* is a common foodborne pathogen of humans that has been associated with poultry carcasses and further processed poultry products. Most important is the role of *Campylobacter jejuni* to cause avian vibrionic hepatitis. A comparative studies between microbiological test, immunoenzymatic automated method and multiplex-PCR to detection of *Campylobacter*, was carried out on 52 samples (foods and pathological samples) conferred at diagnostic laboratory of I.Z.S.L.E.R. in Forlì, during 2003.

Correspondence: Laura Fiorentini, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna. Sezione diagnostica di Forlì. Via Marchini n.1- 47100 Forlì. E-mail forli@bs.izs.it

Introduzione

Grazie ai progressi ottenuti nelle tecniche d'isolamento ed identificazione, è stato possibile dimostrare l'importanza eziologica dei *Campylobacter* nell'ambito della microbiologia degli alimenti e della sanità animale. *C. coli*, *C. lari* e *C. jejuni* svolgono un ruolo determinante nelle tossinfezioni alimentari, provocano enterite acuta nell'uomo e pur essendo spesso commensali, possono causare malattia in molte specie animali. Sulla base di studi caso-controllo, si presume che la via di infezione sia soprattutto di origine alimentare e che il consumo di carne cruda o poco cotta rappresenti il fattore di rischio principale (5). Il *Campylobacter* è in grado di sopravvivere molti mesi nella carne macinata e nelle carcasse di pollame congelato; sembra anzi sopravvivere meglio in ambienti refrigerati che a temperatura ambiente. La moltiplicazione del batterio richiede invece temperature superiori a 30°C. La temperatura di crescita ottimale è compresa tra i 42° e 47°C. Tuttavia, dal momento che i *Campylobacter* sono ubiquitari a livello ambientale e sono in grado di colonizzare la maggior parte delle specie di interesse zootecnico, l'origine e le modalità di infezioni nell'uomo sono ancora oggetto di discussione. L'esame colturale, immunoenzimatico e la *polymerase chain reaction* (PCR), rappresentano le tecniche di laboratorio attualmente impiegate per l'isolamento ed identificazione dei *Campylobacter* sia nel campo della microbiologia degli alimenti che della sanità animale.

Materiali e metodi

In un periodo di tempo compreso tra gennaio ed agosto 2003, sono stati analizzati 52 campioni; alcuni erano alimenti di origine animale, altri erano costituiti da materiale patologico (fegato, duodeno e ciechi) prelevato in sede autoptica a partire da polli con lesioni riferibili ad epatite vibrionica. Per queste matrici sono state applicate le tecniche sopra menzionate al fine di valutare vantaggi e svantaggi di ciascuna metodica.

Esame colturale

Metodo qualitativo che richiede 4 successivi passaggi (1), (2), (4). A) Arricchimento in terreno liquido selettivo (*Campylobacter Enrichment Broth Modificato*), inoculato con il campione in esame e, dopo omogeneizzazione, incubato in termostato a 42°C per 48 ore. B) Isolamento in piastra su terreni solidi selettivi *Karmali* e *Preston*, incubazione entro un

sistema adatto per microaerofilia in termostato a 42°C per 48 ore. C) Trapianto di colonie sospette (colonie piccole lucide di colore rosa su terreno Preston e colonie piccole pastose biancastre su terreno Karmali) in agar sangue, da incubare in microaerofilia a 42°C per 24 ore. D) Identificazione con colorazione di Gram, prove biochimiche (catalasi, idrolisi dell'ippurato), prove di sensibilità agli antibiotici (acido nalidixico e cefalotina).

Tabella 1: Identificazione dei *Campylobacter*.

Table 1: *Campylobacter* identification

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Catalasi	+	+	+
Idrolisi dell'ippurato	+	-	-
Acido nalidixico	S*	S	R
Cefalotina	R**	R	R

*Sensibile **Resistente

Sistema immunoenzimatico (VIDAS[®], BioMerieux, F)

E' un test immunoenzimatico automatizzato che si avvale di anticorpi monoclonali per la ricerca di antigeni del *Campylobacter* con metodo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (6). E' stato sviluppato come metodo di *screening* rapido, consentendo la rilevazione in 48 ore.

Multiplex-PCR

L'estrazione del DNA batterico viene fatta dal terreno di arricchimento dopo 48 ore d'incubazione.

L'estrazione del genoma batterico avviene secondo il protocollo QIAamp DNA mini kit (Qiagen-Hialden®, Germany). Il DNA estratto viene utilizzato direttamente nel saggio della multiplex-PCR applicando la metodica richiesta dalla PlatinumTaqPCRx DNAPolymerase (Invitrogen®, USA). Nella multiplex-PCR fungono da innesco alla reazione 3 coppie di *primers* specifiche per i tre *campylobacter* considerati (tab.2). La reazione di amplificazione avviene secondo il seguente profilo: 2 minuti a 94°C, seguiti da 35 cicli costituiti da 3 *step*: 94°C per 30 secondi, 56°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi (3). Il prodotto amplificato viene purificato tramite il *kit* QIAquick PCR Purification (Qiagen-Hialden®, Germany), e sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5%, con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV. Quando il campione risulta positivo per il *C.jejuni* si utilizza il DNA estratto per un'ulteriore PCR con *primers* specifici per il gene *Hip* (gene che codifica l'enzima per l'idrolisi dell'ippurato).

Risultati

L'esame colturale su 52 campioni ha permesso di isolare 21 (40%) ceppi di *C. jejuni*, 6 (12%) di *C. lari*, 2 (4%) di *C. coli* e 23 sono risultati negativi. Per quanto riguarda il *C. coli* ed il *C. lari* i risultati sono stati confermati dalla multiplex-PCR, mentre per il *C. jejuni* si sono ottenute 36 (69%) identificazioni positive contro 21 (40%) del metodo colturale. I risultati ottenuti con i metodi ELFA e multiplex-PCR sono sovrapponibili: 44 (85%) positivi, 8 (15%) negativi, con il limite del sistema automatizzato di non tipizzare i campioni positivi. I risultati sono schematizzati nelle figure 1, 2 e 3.

Tabella 2: Sequenza dei primers.

Table 2: Sequence of primers.

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA	PER
C-1	5' CAATAAGTTAGAGGTAGAATGT 3'	<i>C. jejuni</i>
C-4	5' AGTCGATCGATCACGAATAGG 3'	<i>C. coli</i>
HIP-F	5' GAAGAGGGTTTGGGTGGTG 3'	<i>C. jejuni</i>
HIP-R	5' AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG 3'	<i>C. coli</i>
CC18-F	5' GGATGATTTCTACAAAGCGAG 3'	<i>C. coli</i>
CC519-R	5' ATAAAAGACTATCGTCGTG 3'	<i>C. coli</i>
CL-55	5' ATGGAAGTCGAACGATGAAGCGAC 3'	<i>C. lari</i>
CL-632	5' CCACTCTAGATTACCAGTTTCCC 3'	<i>C. lari</i>

Discussione e Conclusioni

Esame colturale

La metodica microbiologica tradizionale consente di ottenere ceppi vivi utili per studi epidemiologici e prove sperimentali. I tempi minimi necessari per l'isolamento e la tipizzazione batterica sono compresi tra 6 e 7 giorni. I batteri devono essere presenti, nei campioni analizzati, vivi e con capacità replicative. Al contrario degli alimenti, i campioni patologici sono spesso fortemente inquinati e ciò può costituire un ostacolo al possibile isolamento dei *Campylobacter*.

Sistema ELFA

E' una tecnica rapida (48 ore) e sensibile; la standardizzazione delle procedure riduce al minimo gli errori legati al fattore uomo. Non consente la tipizzazione batterica (i risultati vengono espressi come positivo/negativo *Campylobacter spp.*); per questo motivo trova utile impiego negli screening preliminari. E' un sistema nato per le esigenze diagnostiche in campo alimentare, quindi altri studi dovranno essere condotti per stabilire la reale utilità nel settore della sanità animale. I risultati fino ad ora ottenuti sono in tal senso incoraggianti.

Multiplex-PCR

E' una tecnica sensibile e specifica in grado di valutare la presenza di *C. coli*, *C. lari* e *C. jejuni* con un'unica analisi in tempi relativamente brevi (72 ore). Per il *C. jejuni*, è possibile ottenere un'ulteriore conferma applicando una seconda PCR finalizzata all'identificazione del gene Hip. Non consente di valutare la capacità replicativa del germe: la presenza del batterio non sempre è indice di malattia nell'ambito della sanità animale né di contaminazioni rilevanti per le tossinfezioni alimentari.

Dai risultati ottenuti si evince che il sistema automatizzato ELFA, nel quale i risultati vengono espressi in negativo/positivo trova miglior campo di applicazione nel settore della microbiologia degli alimenti. Il metodo microbiologico consente in 7 giorni di isolare ed identificare il germe. La multiplex-PCR permette, in un unico step, di identificare e tipizzare il genoma batterico in 72 ore. L'ideale sarebbe poter applicare le tre tecniche contemporaneamente al fine

di ottimizzare i risultati ottenuti sia nel settore della ricerca scientifica che nella routine diagnostica.

Ringraziamenti

Si ringrazia tutto il personale tecnico della sezione diagnostica di Forlì, per la preziosa collaborazione.

Bibliografia

- Bergey's (1984). Manual of systematic bacteriology. William Wilkins Ed. Baltimore USA 245-249
- Carter G.R. e Cole J.R (1990). Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th edition, 61-75.
- Chuma T., Hashimoto S., Okamoto K. (2000). "Detection of Thermophilic *Campylobacter* from Sparrows by Multiplex PCR: The Role of Sparrows as a Source of Contamination of Broiler with *Campylobacter*". *J. Vet. Med. Sci.* 62 (12): 1291-1295
- Cocchi M., Massi P., Tosi G., Tamba M. (2001). "Presenza di *Campylobacter spp.* nella carne di pollame macellata in Romagna". *Large Animals Review*, anno 7, numero 8.
- Newell D.G. (2001). "La sub-tipizzazione del *Campylobacter jejuni* ed il suo utilizzo pratico nelle indagini epidemiologiche delle campilobacteriosi aviare". *Large Animals Review*, anno 7, numero 8.
- Stern N.J. (2001). "Tracking *Campylobacter spp.* In poultry operation and humans". *La selezione veterinaria* 11: 998-1001.

Figura 1. Esame colturale

Figure 1. Microbiology method

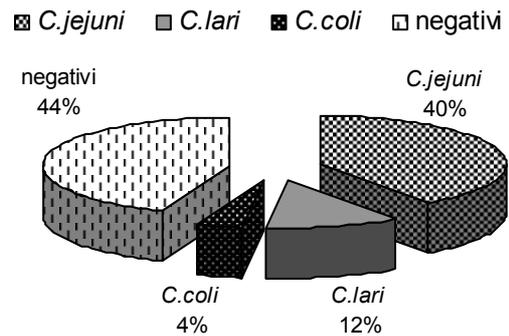


Figura 2. Sistema ELFA

Figure 2. ELFA system

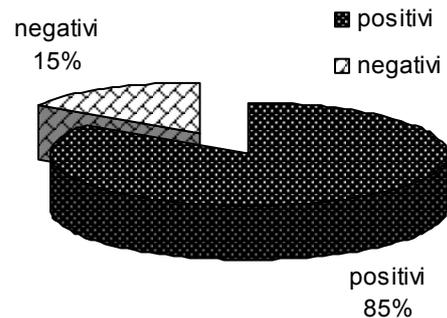
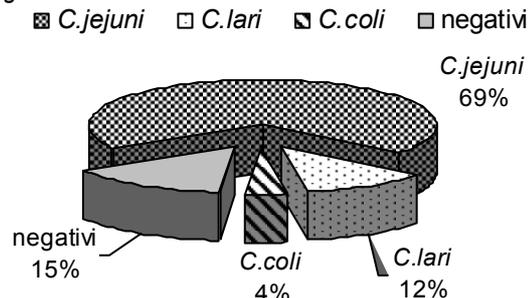


Figura 3. Risultati PCR

Figure 3. PCR data



COMUNICAZIONE 15

POLYMERASE CHAIN REACTION E COLTURE CELLULARI: DUE TECNICHE DIAGNOSTICHE A CONFRONTO PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA AVIARE

F. Paganelli, L. Fiorentini, R. Leonelli

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

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

Polymerase chain reaction and cell line: two diagnostic methods in comparison to identify the chicken anaemia virus

Key words: chicken anaemia virus, polymerase chain reaction, MDCC-MSB1

Summary: Chicken infection anaemia (CIA) is a viral disease of chicken and causes economic losses because of death in young chicks, growth retardation, secondary infections. The diagnosis of CIAV has typically been carried out by serological procedures and isolation of the virus. CIAV DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR), and the results of CIAV detection by PCR and by MDCC-MSB1 were compared.

Correspondence: Francesca Paganelli, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Sezione diagnostica di Forlì- Via Marchini n°1- 47100 Forlì. E-mail forli@bs.izs.it

Introduzione

Il virus dell'anemia infettiva del pollo (CIAV) è l'agente causale dell'anemia infettiva aviaria (CIA) che venne descritta per la prima volta da Yuasa *et al.* nel 1979 (4). Si tratta di una malattia virale trasmissibile del pollo il cui agente eziologico è ubiquitario e molto resistente nell'ambiente. Nell'animale determina un'anemia aplastica generalizzata con prevalente atrofia transitoria linfoide T e conseguente depressione della risposta immunitaria cellulomediata. L'infezione da CIAV avviene sia per trasmissione verticale che orizzontale. In diagnostica viene usata prevalentemente la linea cellulare MDCC-MSB1 (linfoma splenico) per identificare ed isolare il virus CIAV. Nel 2002 abbiamo dimostrato la possibilità di utilizzare la *polymerase chain reaction* (PCR) per identificare il virus dell'anemia infettiva da sospensioni cellulari risultate positive sulla linea cellulare MDCC-MSB1 (3). Da gennaio 2003 abbiamo iniziato ad applicare la tecnica molecolare nella routine diagnostica sempre in parallelo con l'esame tradizionale su colture cellulari. In questo modo abbiamo potuto verificare l'utilizzo della tecnica di PCR per l'identificazione del virus.

Materiali e metodi

Infezione su colture cellulari

L'inoculo è stato allestito a partire da midollo femorale, fegato e milza. Il materiale di partenza è stato omogenato con PBS antibiotato, centrifugato a 3,000 x g e filtrato a 450 nm. Sono state utilizzate colture cellulari in sospensione MDCC-MSB1, che richiedono il *medium* RPMI-1640 addizionato con il 8% di siero fetale bovino e il 7% di *tryptose phosphate broth* (TPB). Le colture cellulari infettate sono state incubate a 39°C, CO₂ 5%. Ogni 48 ore è stata effettuata una subcoltura fino a 10 passaggi. La positività è rappresentata da un effetto citopatico ben visibile al microscopio ottico: mortalità cellulare, cellule globose e deformi, disaggregazione della cromatina con occasionale presenza di vacuoli nucleari (3).

Estrazione del DNA e PCR

Lo stesso campione inoculato sulle MDCC-MSB1 è stato utilizzato per la ricerca del genoma virale. L'estrazione del DNA virale dal materiale patologico è stata eseguita secondo il protocollo QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-Hialden®, Germany). Il prodotto di estrazione è stato utilizzato direttamente nel saggio di

PCR previa l'aggiunta dei reagenti che fanno parte della PlatinumTaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione i *primers* CA1N+ e CA2N- che producono un frammento di 480 bp (tab.1) (1). La reazione di PCR avviene secondo il seguente profilo: 5 minuti a 94°C, seguiti da 35 cicli costituiti da 3 *step*: 94°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 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 negativo. La specificità dei prodotti di PCR è stata confermata con l'utilizzo degli enzimi di restrizione PstI e SacI (2).

Tabella 1: Sequenza dei primers.

Table 1: Sequence of primers.

PRIMERS	SEQUENZA NUCLEOTIDICA
CA1N+	5'-CCAAGAAGATACTCCACCCG-3'
CA2N-	5'-TACGATACCGCGTGCTCCTC-3'

Risultati

Da gennaio 2003 a luglio 2003 sono stati analizzati 44 casi clinici che presentavano una sintomatologia ascrivibile a CIAV. E' stata eseguita la ricerca del virus sia su colture cellulari MDCC-MSB1 sia con la tecnica di PCR. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2 e nella figura 1.

Tabella 2: Risultati

Table 2: Results

CAMPIONI	PCR	MDCC-MSB1
POSITIVO PER CIAV (%)	18 (40,9)	4 (9)
NEGATIVO PER CIAV (%)	26 (59)	40 (90,9)

Discussione

I risultati ottenuti dimostrano un'elevata sensibilità e specificità della tecnica di PCR per l'identificazione del CIAV. Sono risultati positivi 18 campioni su un totale di 44 tramite la tecnica di biologia molecolare, contro i 4

campioni rilevati con le colture cellulari. E' necessario sottolineare le diverse caratteristiche dei due metodi considerati. Con le colture cellulari si isola il virus con capacità replicative, mentre con la tecnica di PCR è possibile solo identificare la presenza del genoma virale, non è possibile valutare se il virus è vivo ed integro, in fase replicativa o dormiente. Quindi per studi epidemiologici e sperimentali è necessario ricorrere all'utilizzo della linea cellulare MDCC-MSB1 che permette di isolare il virus in esame.

Ai fini diagnostici è importante considerare le caratteristiche di ogni tecnica utilizzata in modo da rapportarle ai dati anamnestici e al quadro anatomopatologico del caso clinico in esame.

Non bisogna dimenticare la rapidità di esecuzione della tecnica di PCR rispetto all'utilizzo delle colture cellulari: 2 giorni contro i 15-20 giorni necessari per le MDCC-MSB1.

Inoltre per svelare infezioni subcliniche la PCR risulta il metodo noto più sensibile e rapido.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

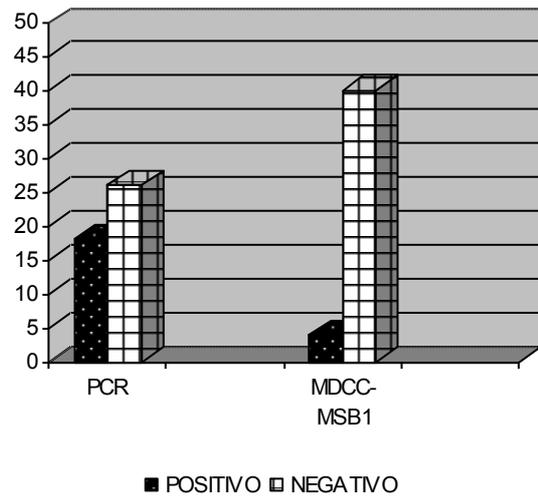
1. Imai K., Mase M., Yamaguchi S., Yausa N., Nakamura K. (1998). "Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissue by polymerase chain reaction". *Research in Veterinary Science*, 64, 205-208.
2. Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D., Muller H. (2001). "Genetic determinants of in vitro growth of chicken anaemia virus" in: *II International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious*

Anaemia, Rauscholzhause, Germany, 16-20 June 2001, 130-143.

3. Paganelli F., Massi P., Tosi G. (2002). "Identificazione del virus dell'anemia infettiva del pollo con la polymerase chain reaction". *Large Animals Review*, anno 8, numero 6, bimestrale 2002.
4. Yuasa N., Taniguchi T., Yoshida I. (1979). "Isolation and some characteristics of an agent inducing anaemia in chicks". *Avian Diseases*, 23, 366-385.

Figura 1: Risultati

Figure 1: Results



COMUNICAZIONE 16

UTILIZZO DELLA RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) PER DIFFERENZIARE CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* VACCINALI DA CEPPI DI CAMPO

F. Paganelli, L. Fiorentini, R. Leonelli

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

Parole chiave: *Mycoplasma gallisepticum*, Random Amplified Polymorphic DNA, vaccino

Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* vaccines and field strains

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, Random Amplified Polymorphic DNA, vaccine

Summary: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) is the most economically significant mycoplasma pathogen of poultry, and has a world-wide distribution. Control of MG infection in poultry can be obtained through eradication, treatment, or vaccination programs. In Italy 2 MG vaccine strains (ts-11, 6/85) are commercially available.

Molecular analysis of MG field isolates can provide important epidemiological information of determining the source of the infection. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis is a molecular technique that allows for differentiation of MG at the strain level.

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

Introduzione

La micoplasmosi da *Mycoplasma gallisepticum* (MG) è una patologia prevalentemente respiratoria del pollame, nota da molto tempo e ancora oggi non risolta. Nel nostro paese, infatti, negli ultimi anni ha avuto una recrudescenza nel pollo e nel tacchino causando gravi perdite economiche (4). Il controllo dell'infezione da MG può essere ottenuto con l'eradicazione, il trattamento farmacologico o programmi di vaccinazione. Nel nostro paese sono registrati due vaccini vivi non patogeni: 6/85 e ts-11.

La differenziazione dei ceppi vaccinali rispetto a quelli di campo è molto importante per poter identificare problemi correlati alla vaccinazione, per identificare ceppi di campo responsabili della patologia presente o per indagare epidemiologiche.

I ceppi di MG possono essere distinti sulla base dello studio della patogenicità e della caratterizzazione genotipica e fenotipica (5).

È possibile dimostrare la diversità dei ceppi vaccinali rispetto ai ceppi di campo utilizzando una RAPD (*random amplified polymorphic DNA*); si utilizza una *kit* commerciale contenente 6 *primers* che permette di ottenere un *patterns* di bande differente fra i ceppi vaccinali e i ceppi di campo (1).

Materiali e metodi

Ceppi di *Mycoplasma*. Sono stati impiegati nella prova 3 ceppi di MG isolati da galline leggere, non vaccinate. Un ceppo di MG isolato da riproduttori pesanti, non vaccinati, e un ceppo di MG isolato da galline ovaiole vaccinate con il 6/85. Tutti i soggetti osservati presentavano una sintomatologia e lesioni anatomopatologiche riferibili a micoplasmosi. Sono stati infine utilizzati i due ceppi vaccinali utilizzati in Italia: ts-11 e il 6/85.

Identificazione MG. Tutti i ceppi studiati sono stati identificati tramite una *polymerase chain reaction* (PCR), previa estrazione del DNA a partire da campioni di essudato tracheale o tamponi tracheali (3). 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

5'GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3' e il *primer* "reverse" MG-R 5' GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC 3'.

La reazione avviene in un termociclatore automatizzato (*Tpersonal*™, Biometra, Germany) secondo il seguente profilo di amplificazione: 5 minuti a 94°C seguito da 35 cicli costituiti da 3 *step*: 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto; al termine dei cicli 1 minuto a 72°C per eventuali estensioni. Il prodotto amplificato se positivo per MG presenta un frammento di 185 bp (3).

RAPD analisi. Il DNA estratto viene sottoposto ad una ulteriore PCR utilizzando il *kit* commerciale Ready-to-go RAPD Analysis (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) il quale contiene un *set* di 6 *primers*. Per ogni campione si eseguono 6 reazioni distinte per ogni *primer* utilizzato (Tabella 1) aggiungendo i reagenti necessari previsti dal protocollo di esecuzione del *kit*. I campioni vengono posti nel termociclatore dove si esegue un ciclo a 95°C per 5 minuti seguito da 45 cicli costituiti da tre *step*: 1 minuti a 95°C, 1 minuti a 36°C e 2 minuti a 72°C. Infine 1 ciclo a 4°C fino a quando non si rimuovono i campioni dal termociclatore.

I frammenti di DNA amplificati vengono separati tramite una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% con aggiunta di bromuro di etidio. I gel vengono osservati al transilluminatore ad UV comparando fra loro i vari *patterns* ottenuti riferendosi sempre al *marker* Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus (1).

Tabella 1: Sequenza dei primers per RAPD
Table 1: Sequence of RAPD analysis primers

RAPD PRIMERS	
1	5'-d [GGTGC GGAA]-3'
2	5'-d [GTTTCGCTCC]- 3'
3	5'-d [GTAGACCCGT]- 3'
4	5'-d [AAGAGCCCGT]- 3'
5	5'-d [AACGCGCAAC]- 3'
6	5'-d [CCCGTCAGCA]- 3'

Risultati

I *primers* 1 e 5 non presentano differenze sostanziali fra i vari ceppi analizzati, mentre il *primer* 6 e la combinazione dei *primers* 3 e 4 presentano una buona

discriminazione fra i ceppi di MG identificati. I profili ottenuti con il *primer* 6 presentano per tutti i ceppi da 1 a 3 bande di maggiore intensità nel *range* fra 350-2000 bp. La banda a 350 bp è comune a tutti gli isolati di MG, anche nei due vaccini.

I profili di amplificazione ottenuti con la combinazione dei due *primers* 3 e 4 sono differenti rispetto a quelli prodotti dal *primers* 6, ma si presentano comunque in un *range* compreso fra 350 e 2000 bp. Anche questi *primers* determinano da 1 a 3 bande di maggiore intensità, fra cui una banda a 820 bp comune a tutti gli amplificati considerati. I ceppi di MG analizzati presentano un *patterns* di bande diverso rispetto ai due vaccini considerati, non ci sono analogie sostanziali. E' molto chiara la differenza fra i ceppi vaccinali di MG e i ceppi di campo.

Discussione

La possibilità di separare i vari ceppi di MG richiede di considerare le similitudini e le differenze per una varietà di caratteristiche. La RAPD non è altro che un sistema di analisi che si avvale di *primers* specifici e di una PCR per dimostrare differenze *random* presenti nel genoma del microrganismo. Nei profili di amplificazione ottenuti per poter classificare i ceppi in esame si prendono in considerazione sia le bande specifiche ed uniche di un singolo campione sia le bande comuni a più campioni studiati. Il *primer* 6 e i *primers* 3-4 producono una banda comune a tutti gli MG identificati, rispettivamente a 350 bp e 820 bp. Sebbene non sia stata dimostrata la specificità di queste bande per MG, l'assenza di esse richiede comunque un'ulteriore controllo al fine di identificare l'MG in esame. Con i due profili ottenuti, con i due *set* di oligonucleotidi, è molto chiara la differenza fra i ceppi di campo analizzati e i due vaccini considerati.

L'utilizzo dei 2 *set* di *primers* permette di discriminare maggiormente i ceppi di MG rispetto all'utilizzo di un solo oligonucleotide.

Sebbene sia presente una discrepanza fra i differenti *primers* utilizzati, la separazione dei ceppi di MG è valorizzata dall'utilizzo multiplo di *set* di *primers* e da una procedura interna di controllo.

E' molto importante la scelta dei *primers*, infatti i *primers* 1 e 5 del *kit* si sono dimostrati non necessari per la differenziazione dei ceppi di MG (1). Questa metodica si è dimostrata molto utile soprattutto per comparare ceppi di campo con i ceppi vaccinali utilizzati sul territorio. Si ottengono dei *patterns* molto differenti a livello delle bande di maggiore intensità, facili da distinguere. Sicuramente la RAPD può essere usata con facilità nelle procedure diagnostiche per differenziare ceppi di campo da ceppi vaccinali, in modo da risolvere possibili problemi d'interpretazione diagnostica o per studiare l'andamento epidemiologico della patologia nei gruppi colpiti.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

1. Charlton B.R., Bickford A.A., Walker R.L., Yamamoto R. (1999). "Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains". *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 158-161.
2. Lauerman L.H., Hoer 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 Diseases*, 37, 829-834.
3. Paganelli F., Massi., Tosi G. (2002). "Applicazione del metodo polymerase chain reaction alla diagnosi di *Mycoplasma gallisepticum* e di *Mycoplasma synoviae*" *Large Animals Review*, anno 8, numero 6, bimestrale 2002.
4. Stipkovits L., Kempf I. (1996). "Mycoplasmosis in Poultry". *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 15, 1495-1525.
5. Yogev D., Levisohn S., Kleven SH., Halachmi D., Razin S. (1988). "Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*". *Avian Diseases*, 32, 220-231.

COMUNICAZIONE 17

SINDROME NEUROLOGICA PERIFERICA (PNS) IN GALLINE LEGGERE BIANCHE

P. Massi, R. Leonelli, D. Gelmetti, L. Fiorentini, G. Tosi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

Parole chiave: galline leggere, paralisi periferica.

Peripheral neuropathy syndrome (PNS) in white layer chickens

Key words: layer chickens, peripheral paralysis.

Summary: a clinical neurological syndrome observed in two flocks of white commercial layers is described. Based on age of onset of clinical signs, genetic strain of affected chickens, absence of visceral lymphomas and histological lesions the observed syndrome could be distinguished from Marek's Disease (MD). It resembles a syndrome termed peripheral neuropathy (PNS). Many authors postulated that PNS may represent an autoimmune reaction to nerve tissue that may result from response to a combination of common vaccines.

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

Introduzione

La forma classica della Malattia di Marek (MD) si presenta fra i 3 e i 5 mesi di vita con lesioni che interessano i nervi periferici provocando infiltrazione linfoide, demielinizzazione e paralisi degli arti. E' comune il coinvolgimento dei nervi brachiali e ischiatici con progressiva paralisi di tipo spastico delle ali e delle zampe. I soggetti colpiti non sono in grado di deambulare e di mantenere la posizione eretta ed alcuni presentano il divaricamento degli arti. Nel nostro Paese la MD è tenuta sotto controllo grazie al largo utilizzo della profilassi vaccinale. In particolare le linee leggere vengono vaccinate ad un giorno di vita per via intramuscolare nel collo e nella coscia con una dose doppia di due vaccini contenenti rispettivamente il sierotipo 3 (ceppo HVT) ed il sierotipo 1 attenuato (ceppo CVI 988). Nel presente lavoro si descrive una sindrome neurologica periferica che frequentemente si osserva nelle linee commerciali leggere con caratteristiche simili alla forma classica della MD ma che si diversifica per i seguenti aspetti: età di comparsa, indice di morbilità e mortalità, assenza di lesioni viscerali e andamento nel tempo. In particolare si riportano i dati relativi a due casi clinici di paralisi spastica periferica in galline bianche leggere.

Materiale e Metodi

Dati di campo

Dei due casi in esame venivano raccolti i dati anamnestici, i segni clinici, gli indici di morbilità, mortalità e l'andamento nel tempo.

Indagini di laboratorio

Sui soggetti conferiti al laboratorio venivano eseguiti i seguenti accertamenti: esame anatomo-patologico ed esame isto-patologico (sui nervi ischiatici prelevati in sede necroscopica). Quest'ultimo veniva eseguito su 12 soggetti. I nervi ischiatici venivano fissati in formalina tamponata al 10 %, inclusi in paraffina secondo le comuni metodiche istologiche, sezionati a 5 micron, colorati con ematossilina-eosina e mediante la colorazione di *Heidehein-Woecckle* per la mielina.

Risultati

Dati di campo

Caso n.1

Gruppo di 65000 pollastre allevate a terra. A partire dai 45 giorni di età si osservava una sindrome neurologica che colpiva soprattutto le zampe causando una mortalità giornaliera di circa 30 soggetti. Gli animali colpiti mantenevano un decubito sternale o laterale con arti divaricati "a forbice". La lesione era

irreversibile e i soggetti colpiti venivano eliminati o morivano a causa di fenomeni di cannibalismo o di inedia. La sindrome si protraeva fino alla dodicesima settimana interessando il 3,5% del gruppo.

Caso n.2

Gruppo di 103000 pollastre allevate in gabbia. La sindrome neurologica presentava un andamento sovrapponibile al caso precedente fatta eccezione per un minor indice di morbilità (1,5%).

Indagini di laboratorio:

In entrambi i casi all'esame anatomo-patologico si osservavano le seguenti lesioni macroscopiche: apparato gastroenterico vuoto, disidratazione, lesioni da cannibalismo e ingrossamento (mono o bilaterale) dei nervi ischiatici. Non venivano osservate lesioni neoplastiche viscerali o altri quadri patologici.

In entrambi i casi la descrizione istologica era la seguente: In 23/24 campioni era presente una neurite linfo-plasmacellulare. Nei casi più lievi gli infiltrati erano focali distribuiti attorno ai capillari intraneurali. Nei casi più avanzati, unitamente ai quadri infiammatori erano osservabili lesioni degenerative delle fibre mieliniche. Queste ultime apparivano edematose, rigonfie, frammentate fino a perdere completamente il rivestimento mielinico. In questi casi l'infiltrato infiammatorio si insinuava tra le fibre, era abbondante e non mancavano macrofagi con ampio citoplasma contenente frammenti di mielina.

Discussione

La neurite descritta non si discosta dalle lesioni di tipo B osservate in corso di MD neurale. Tuttavia la linea genetica di appartenenza, l'età di insorgenza della patologia, il decorso clinico e l'assenza nei due allevamenti controllati di intercorrenti forme neoplastiche viscerali porta ad escludere, anche se in modo non categorico, l'ipotesi che queste neuriti siano l'espressione di una forma neurale della MD. Inoltre l'intensa demielinizzazione osservata nei casi più gravi sembra compatibile con una patologia autoimmune conosciuta come "neuropatia periferica" (PNS) (2). Tale sindrome era stata descritta fin dalla metà degli anni '60 (4). L'incidenza variava dallo 0 al 3 %, interessando solo certe linee genetiche leggere e non era da confondere con la forma classica della MD. Le differenze significative sono da ricondursi all'età dei gruppi colpiti (3) e al fatto che nella PNS nessuno dei soggetti colpiti presenta lesioni neoplastiche viscerali. Inoltre questa patologia colpisce maggiormente le linee leggere bianche che si mostrano più sensibili

rispetto alle linee genetiche rosse . La peculiarità della lesione istologica si configura nel processo, a vari stadi, di demielinizzazione la cui patogenesi, non del tutto chiarita, continua a suscitare l'interesse degli studiosi in quanto molto simile alla neurite idiopatica dell'uomo. Bacon e Witter (1) studiando polli con la neuropatia periferica (PNS) trovarono che l'incidenza della lesione neurale era fortemente condizionata dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), rilevando la presenza di anticorpi diretti contro la mielina. Questi ultimi testimoniano la natura autoimmune del processo demielinizzante. I linfociti che accorrono in seguito alla stimolazione antigenica liberano linfotossine che, a loro volta, danneggiano la guaina mielinica. Bacon *et al.* (2) hanno dimostrato che la PNS può essere il risultato di una risposta autoimmune del MHC. Nei polli la regione genomica MHC è chiamata "*locus B*" e comprende diversi aplotipi. Sembra che l'aplotipo B19 sia responsabile della sensibilità alla MD (2) e dell'insorgenza della PNS (1). Questo suggerisce che un epitopo comune (nella mielina o nel tessuto nervoso) può essere riconosciuto nei polli con MD e PNS.

Gli Autori suggeriscono, alla luce di diverse prove sperimentali, che la vaccinazione con vaccini multipli o con più valenze antigeniche possa predisporre alla PNS in linee genetiche sensibili. Nei due casi clinici descritti le pollastre erano state vaccinate per BI, NDV, IBDV, e sottoposte alla doppia vaccinazione per MD con il ceppo HVT ed il ceppo CVI 988. Nella realtà di campo tale patologia si osserva nelle linee leggere

con una certa frequenza e manifesta indici di morbilità e mortalità molto variabili (dallo 0,1 % al 3-4 %).

La variabilità è condizionata da svariati fattori: linea genetica, tipo e sistema di allevamento, patologie intercorrenti, programmi vaccinali. La PNS ha la caratteristica dell'irreversibilità. Anche nei casi descritti si è tentato, senza risultati, di ridurre i danni mediante la somministrazione di calcio gluconato, fosforo e vitamine del gruppo B. D'altra parte un controllo della sindrome tramite la selezione genetica sembra, attualmente, alquanto difficoltosa, in quanto si dovrebbe condurre una selezione anti aplotipo sensibile nel MHC. In conclusione si può affermare che i due episodi segnalati si sovrappongono per andamento clinico, linea genetica e quadro istopatologico a quanto descritto dagli Autori citati.

Bibliografia

1. Bacon, L.D. and Witter, R.L. (1994). "B haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines in commercial chickens". *Poultry Science*, 73,481-487.
2. Bacon L.D., Witter R.L., Silva R.F. (2001). "Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens". *Avian Pathology*, 30,487-499.
3. Calnek B.W. Witter R.L. (1997). "Marek's disease". *Disease of Poultry* 10th ed. (369-413). Ames. IA: Iowa State University Press.
4. Julian R.J. (1992). "Peripheral neuropathy causing "range paralysis" in leghorn pullets". In *Proceedings of the 129th Annual Meeting America Veterinary Medical Association*, Boston, MA, August 1-5 (p.130).

COMUNICAZIONE 18

PRIMO ISOLAMENTO DI *BRACHYSPIRA INTERMEDIA* DAL POLLO IN ITALIA

L. Bano^{1,2}, D. Comin¹, F. Agnoletti¹, M. Merola³, P. Bonilauri⁴, G. Meriardi⁴

¹IZS delle Venezie – Laboratorio di Treviso, Italia; ²Scuola di specializzazione in patologia e tecnologia delle specie avicole, del coniglio e della selvaggina, Università degli Studi di Milano, Italia; ³Medico Veterinario libero professionista, Treviso, Italia;

⁴IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione diagnostica provinciale di Reggio Emilia, Italia

Parole chiave: pollo, *Brachyspira intermedia*, enterite

First isolation of *Brachyspira intermedia* from poultry in Italy

Key words: poultry, *Brachyspira intermedia*, enteritis

Summary: Avian intestinal spirochaetosis (AIS) is a subacute to chronic non septicemic disorder characterised by variable clinical illness, morbidity and mortality. The colonisation of the gastrointestinal tract by spirochetal bacteria has been demonstrated in several avian species in many countries. The presence in the intestinal tract of micro-organisms belonging to the genus *Brachyspira*, has been associated to clinical signs and reduced productions. Three species of the genus *Brachyspira* are currently considered to be capable of causing disease in chickens: *Brachyspira intermedia*, *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira alvinipulli*. This communication describes the first isolation of *Brachyspira intermedia* from laying hens in Italy.

Correspondence: Luca Bano, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Laboratorio di Treviso, Viale Brigato Treviso 13/A – 31100 Treviso, Italia. E-mail at2tv@izsvenezie.it

Introduzione

Le prime segnalazioni cliniche e anatomopatologiche della spirochetosi intestinale aviaria risalgono agli inizi del '900, ma solo nel 1986 Davelaar (3) ha dimostrato la presenza di spirochete sulla mucosa intestinale di ovaiole malate. Ulteriori studi condotti in Olanda, Inghilterra, Usa e Australia hanno consentito di rilevare che si tratta di una patologia comune nel pollame, ma la cui prevalenza è notevolmente sottostimata poiché l'isolamento di *Brachyspira spp.* richiede metodiche che non rientrano nelle procedure routinarie dei laboratori diagnostici (6). Ad oggi, tre specie di spirochete sono state riconosciute come potenziali patogeni nel pollame: *Brachyspira intermedia*, *B. pilosicoli* e *B. alvinipulli* (6).

La spirochetosi intestinale aviaria (AIS) è definita come una patologia enterica subacuta o cronica, caratterizzata da quadri clinici, morbidità e letalità variabili. (8). La forma clinica si manifesta con quadri di gravità variabile, caratterizzati da diarrea, umidità della lettiera, deposizione di uova imbrattate di feci, cloaca imbrattata di materiale fecale, aumento del contenuto in grasso delle feci, ritardi e cali dell'ovodeposizione, riduzione del peso delle uova, aumento del consumo alimentare, ritardi nell'accrescimento, difficoltà nella digestione (6).

Materiali e metodi

In uno dei due capannoni di un allevamento di 50.000 galline ovaiole in deposizione, al raggiungimento della trentasettesima settimana di vita si è manifestata una sintomatologia caratterizzata da diarrea, presenza di alimento indigerito nelle feci, aumento del contenuto di acqua nella pollina, imbrattamento fecale della cloaca e delle uova deposte. La morbidità era del 40% mentre non si è evidenziato alcun aumento del tasso di mortalità. Il capannone interessato ospita 35.000 soggetti di razza high-line stabulati in 5 batterie di gabbie disposte su 5 piani; le deiezioni sono raccolte in una fossa profonda a fermentazione naturale. Gli animali sono stati accasati tra le 16 e le 17 settimane di età, dopo aver effettuato le consuete operazioni di soffiaggio, lavaggio e disinfezione dei ricoveri, seguite da un vuoto sanitario di 30 gg.

Dieci soggetti con sintomatologia enterica sono stati sacrificati e conferiti al Laboratorio di Treviso dell'IZS delle Venezie senza essere stati precedentemente

sottoposti ad alcuna terapia. All'esame anatomopatologico si è registrato una abbondante raccolta di liquido nel lume duodenale, che si riduceva procedendo aboralmente. La consistenza delle feci presenti nei ciechi era nella norma mentre la parete duodenale appariva congesta ed edematosa. Non si sono rilevate ulteriori lesioni. Sono state condotte indagini di tipo batteriologico (ricerca di patogeni aerobi e anaerobi, inclusa *Brachyspira spp.*), parassitologico e virologico. Si è proceduto anche al dosaggio di eventuali micotossine dai fegati degli animali conferiti e da un campione di mangime.

L'esame colturale per *Brachyspira spp.* è stato condotto su terreno BAM-SR così come descritto da Calderaro (2). Su tale terreno sono stati seminati raschiati della mucosa intestinale prelevati da diversi soggetti; le piastre sono state incubate in giara in condizioni di anaerobiosi (atmosfera costituita da 80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂), ad una temperatura di 37 °C. La prima ispezione delle colture è avvenuta dopo 72 ore e successivamente ogni 24 ore per 8 gg. ricercando zone debolmente emolitiche in corrispondenza di patina batterica. Da tali zone sono stati allestiti preparati per l'osservazione a fresco al microscopio ottico in contrasto di fase (40X).

Evidenziata la presenza di batteri morfologicamente riconducibili a *Brachyspira spp.*, si è proceduto all'allestimento di sub-colture che sono state inviate all'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione diagnostica di Reggio Emilia, per identificazione tramite PCR. Qui la patina batterica è stata raccolta tramite tampone cotonato e dispersa in 800 ml di PBS pH 7,4. Successivamente la sospensione è stata centrifugata a 14000 R.P.M. per 30". Dal pellet di cellule, è stato estratto il DNA batterico utilizzando il Kit NucleoSpin Tissue (Macherey – Nagel) in accordo con quanto previsto dal protocollo fornito dalla ditta produttrice. Il DNA ottenuto è stato trattato con RNasi (10 ng/ml) over night. I primer utilizzati sono quelli descritti da Fellstrom (5), da Atyeo (1) e da Leser (7), e sono riportati in tab.1. Parallelamente è stato ricavato il profilo biochimico secondo lo schema interpretativo proposto da Fellström (4) utilizzando il Kit APIZIM e attenendosi al protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Tabella1. Primers utilizzati

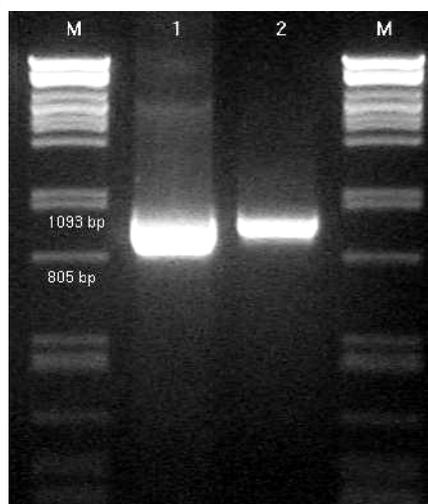
Table 1. Used primers

PRIMER	SPECIE IDENTIFICATA	AUTORE
S Ilf (forward): 5'-CCGTTGAAGGTTTACCGTG-3' S Ilr (reverse): 5'-CGCCTGACAATGTCCGG-3'	<i>B. intermedia</i>	Leser et al. (1997)
SINTF (forward) 5'-GTCCTGAAAGCTTAAAAA-3' SINTR (reverse) 5'-CTAATAAACGTCCAG-3'	<i>B. intermedia</i>	Atyeo et al. (1999)
SINNF (forward) 5'-CTTGAAAGTTTAAAAGCTG-3' SINNR (reverse) 5'-CGATGTATTCTTCTTTTCC-3'	<i>B. innocens/B. murdochii</i>	Atyeo et al.(1999)
IV ^c (forward) 5'-CATAAGTAGAGTAGAGGAAAGTTTT-3' IV ^d (reverse) 5'-CTCGACATTACTCGGTAGCAACAG-3'	<i>B. pilosicoli</i>	Fellstrom et al. (1997)

Risultati

Gli esami batteriologici di routine, virologici e parassitologici non hanno evidenziato la presenza di alcun patogeno convenzionale. L'esame chimico non ha dimostrato la presenza di micotossine nei fegati né in concentrazioni significative nel mangime. Da tutti i soggetti analizzati sono state isolate spirochete debolmente β-emolitiche che sono state sottoposte ad identificazione tramite PCR. Nessun amplificato è stato ottenuto utilizzando i primer specifici per *B. pilosicoli* e *B. innocens /B. murdochii*; utilizzando i primer specifici per *B. intermedia* proposti sia da Leser che da Atyeo, è stato invece possibile ottenere una banda di amplificazione del peso molecolare atteso (foto.1). Il profilo enzimatico ha confermato l'identificazione del ceppo di *B. intermedia*.

Figura 1: M: I Marker di peso molecolare (λ PST I); 1: Prodotto di PCR (1027 bp) ottenuto con SIlf e SIlr 2: Prodotto di PCR (1004 bp) ottenuto con SINTF e SINTR



Discussione

I risultati ottenuti rappresentano la prima segnalazione di isolamento ed identificazione di ceppi di *Brachyspira intermedia* da pollo in Italia.

Il quadro clinico riscontrato conferma quanto riportato in letteratura (6). E' difficile quantificare con precisione i danni subiti dall'allevatore, poiché la sintomatologia è insorta in coincidenza con il cambio di stagione che ha determinato un brusco innalzamento della temperatura con conseguente fisiologico calo dell'ovodeposizione. *Brachyspira intermedia* è stata isolata negli animali con sintomatologia sia dai ciechi (il cui contenuto non mostrava alterazioni evidenti) che da duodeno ed ileo (il cui contenuto appariva invece marcatamente liquido). E' importante sottolineare la presenza di lesioni anche a livello duodenale, fino ad oggi non

riportate in bibliografia (8). In questo focolaio l'allevatore ha preferito non effettuare interventi terapeutici per non avere limitazioni commerciali legate all'osservanza dei tempi di sospensione.

In bibliografia sono reperibili dati relativi a terapie con neomicina, lincomicina, carbadox, tiamulina, composti a base di 5-nitroimidazolo, lincomicina + spectinomocina. In alcuni paesi è consentito l'utilizzo della zinco-bacitracina, che in infezioni sperimentali si è dimostrata efficace alla concentrazione di 50 ppm. Utile si è dimostrata anche l'integrazione della razione con enzimi (xilanasasi e proteasi)(6). Per prevenire o controllare tali infezioni sono fondamentali l'aumento delle misure di biosicurezza, modificazioni della dieta, l'utilizzo di tecniche di competizione microbica. Nei gruppi infetti è molto importante ridurre il contatto tra pollame e feci e gli stress (6). A tale riguardo è da sottolineare che la malattia è esplosa in concomitanza con il cambio di stagione e che non si è manifestata nell'altro capannone in cui la pollina viene quotidianamente allontanata tramite raschiatori.

Bibliografia

1. Atyeo, R.F., T.B. Stanton, N.S. Jensen, D.S. Suriyaarachichi and D.J. Hampson. 1999. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparison and nox-based polymerase chain reaction tests. *Veterinary Microbiology* 67: 47-60.
2. Calderaro A., G. Merialdi, S. Perini, P. Ragni, R. Guégan, G. Dettori and C. Chezzi. 2001. A novel method for isolation of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Veterinary Microbiology* 80: 47-52
3. Davelaar, F.G., H.F. Smit, K. Hovind-Hougen, R.M. Dwars and P.C. Van der Valk. 1986. Infectious typhlitis in chickens caused by spirochetes. *Avian Pathology* 15: 247-258.
4. Fellström, C., and A. Gunnarsson. 1995. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res. Vet. Sci.* 59: 1-4
5. Fellström, C., B. Patterson, J.R. Thomson, A. Gunnarsson, M. Persson and K.E. Johansson. (1997) Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 462-467.
6. Hampson, D.J. and C.P. Stephens. 2002. Control of Intestinal Spirochaete Infections in Chickens. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, Australia.
7. Leser, T. D., M. Moller, T.K. Jensen, and S.E. Jorsal (1997). Specific detection of *Serpulina Hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S DNA. *Moll. Cell. Probes* 11: 363-372.
8. Swayne, D.E., A.J. McLaren.1996. Avian Intestinal Spirochaetes and avian intestinal Spirochaetosis. In: Hampson, D.J. and T.B. Stanton (Eds), *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*, CAB International, Oxon, pp.267-300.

COMUNICAZIONE 19

PROVE PRELIMINARI D'INFEZIONE SPERIMENTALE SU POLLI SPF (SPECIFIC PATHOGEN FREE) CON DUE CEPPI DI *BRACHYSPIRA PILOSICOLI* E UNO DI *BRACHYSPIRA INTERMEDIA*

P. Massi¹, G. Tosi¹, L. Fiorentini¹, R. Leonelli¹, G. Merialdi², M. Dottori²,
P. Bonilauri², M. Calzolari², D. Gelmetti³, L. Bano⁴

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna: ¹Sezione diagnostica di Forlì, ²Sezione diagnostica di Reggio Emilia, ³Sezione diagnostica di Milano. ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione diagnostica di Treviso

Parole chiave: *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia*, polli S.P.F., patogenicità

Experimental infection in SPF chicks with two strains of *Brachyspira pilosicoli* and one strain of *Brachyspira intermedia*: preliminary studies

Key words: *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia*, S.P.F.chicken, pathogenity

Summary. The pathogenic potential of *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* was evaluated in chickens. Three groups of SPF chicks of one day of age were infected, respectively, with a strain of *Brachyspira intermedia* isolated from an egg-table hen flock, a strain of *Brachyspira pilosicoli* isolated from a layer breeder flock and a strain of *Brachyspira pilosicoli* of swine origin. Colonization of intestinal *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia* of poultry origin was longer than swine *Brachyspira pilosicoli*. Infection with *Brachyspira intermedia* had consistent effect on body weight gain and resulted in an increase of fecal water content.

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

Introduzione

Le spirochete intestinali del genere *brachyspira*, sono batteri anaerobi, spiraliformi, che colonizzano il grosso intestino e possono causare malattia enterica in diverse specie animali. Questi organismi hanno esigenze di crescita particolari replicando, infatti, solo su terreni selettivi in condizioni di anaerobiosi. Negli ultimi dieci anni, la colonizzazione intestinale da spirochete è stata riconosciuta come una causa di diarrea e perdita produttiva in riproduttori pesanti e leggeri (7). Nei soggetti adulti con spirochete intestinali, i segni clinici includono diarrea o steatorrea, uova di peso ridotto ed imbrattate di feci, ridotte percentuali di crescita, aumento di consumo dell'alimento e malassorbimento (4) (5). La colonizzazione nei soggetti adulti tende alla cronicizzazione (1).

Tre sono le specie del genere *Brachyspira* identificate come patogene per il pollo: *Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia* e *Brachyspira alvinipulli*. (2) (6). Questa comunicazione descrive un modello d'infezione sperimentale su polli S.P.F. a partire da tre ceppi di brachispire isolati due dalla specie pollo (*Brachyspira pilosicoli*, *Brachyspira intermedia*) ed uno dalla specie suina (*Brachyspira pilosicoli*).

Materiali e metodi

Due sono ceppi di *Brachyspira pilosicoli* impiegati nella prova: uno di origine suina ed uno di origine aviare; quest'ultimo segnalato per la prima volta in Italia da Merialdi G. et al. (3), in un gruppo di 14000 riproduttori leggeri di 50 settimane nei quali era stata segnalata lieve mortalità, feci di consistenza acquosa, lieve flessione della deposizione, decolorazione ed imbrattamento fecale delle uova. I ceppi di *Brachyspira pilosicoli* venivano isolati e tipizzati mediante tecnica PCR presso il laboratorio di biologia molecolare della sezione provinciale di Reggio Emilia dell'I.Z.S.L.E.R. Il ceppo di *Brachyspira intermedia* (isolato presso la sezione diagnostica provinciale di Treviso dell'I.Z.Ve e tipizzato mediante tecnica PCR presso la Sezione Diagnostica Provinciale di Reggio Emilia dell'I.Z.S.L.E.R), derivava da un gruppo di

ovaiole commerciali di 37 settimane affetto da diarrea cronica.

Dati sull'infezione sperimentale

Venivano utilizzati 60 pulcini S.P.F. di un giorno di vita suddivisi in maniera casuale in 4 gruppi da 15 animali ciascuno: A di controllo, B infettato con *Brachyspira pilosicoli* di origine suina, C infettato con *Brachyspira pilosicoli* di origine aviare, D infettato con *Brachyspira intermedia* di origine aviare. La prova veniva condotta in unità isolanti. I pulcini di un giorno venivano infettati con 0,5 ml di una brodocoltura contenente circa 1×10^8 brachispire/ml, inocolata direttamente in ingluvie utilizzando un catetere di polivinile. Venivano soppressi e pesati 5 soggetti per gruppo rispettivamente a 7, 14 e 21 giorni post-infezione. Da ciascun animale veniva prelevato tutto il pacchetto intestinale, di questo, un cieco veniva destinato all'esame batteriologico ed i restanti tratti intestinali all'esame istopatologico.

Esame batteriologico

Il contenuto di ciascun cieco prelevato veniva seminato direttamente in piastre di terreno solido selettivo (TSA, 7% globuli di rossi) supplementato di antibiotici (spectinomicina, rifampicina, vancomicina). Le colture venivano incubate in anaerobiosi a 37°C ed esaminate dopo 3-5 giorni di incubazione. La crescita delle brachispire veniva valutata sulla base delle loro caratteristiche di crescita (patina diffusa) e sulle capacità emolitiche (beta-emolisi). Le colture batteriche venivano esaminate anche microscopicamente (a fresco e mediante colorazione di Gram) al fine di confermare la presenza del germe e quindi l'intensità di moltiplicazione dei diversi ceppi.

Esame istologico

Dagli animali soppressi a 7, 14 e 21 giorni post-infezione (P.I.) appartenenti ai quattro gruppi (A,B,C e D), venivano prelevate porzioni di intestino tenue e cieco, i campioni erano fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina secondo le metodiche istologiche in uso, sezionate a 4 µm e colorati con ematossilina eosina.

Risultati

In tabella 1 vengono riportati i pesi dei soggetti ad ogni prelievo. In tabella 2 vengono riportati i dati relativi alla replicazione batterica.

Tabella 1. Valutazione dei pesi medi dei soggetti prelevati da ciascuna unità isolante.

Table 1. Middleweight valuation

GRUPPO	A	B	C	D
1°PRELIEVO 7gg	390*	390	370	380
2°PRELIEVO 14gg	770	750	750	680
3°PRELIEVO 21gg	1050	1050	1060	1020

*valori espressi in grammi di peso vivo

Tabella 2. Colonizzazione delle brachispire

Table 2. Brachyspira's colonization

GRUPPO	A	B	C	D
1°PRELIEVO 7gg	0/5	5/5	5/5	5/5
2°PRELIEVO 14gg	0/5	5/5	5/5	5/5
3°PRELIEVO 21gg	0/5	2/5	5/5	5/5

Esame istologico: i risultati relativi al gruppo D non vengono riportati perché in fase di ultimazione. I campioni del gruppo A, di controllo, non hanno mostrato reperti di rilievo. La presenza di brachispire nei diversi tratti intestinali prelevati è riassunta in tabella n.3. L'intestino tenue degli animali dei gruppi B e C mostrava lieve edema dei villi e più raramente erosioni apicali con rari granulociti eterofili. Non si notano differenze significative nei tre diversi prelievi né tantomeno brachispire sulla superficie dei villi. Nell'intestino cieco degli stessi erano presenti piccoli gruppi isolati, od aggregati più consistenti di spirochete disposte in modo regolare le une accanto alle altre, adese all'orletto a spazzola. La quantità di spirochete rilevabili all'osservazione microscopica era più consistente negli animali inoculati con il ceppo di *Brachyspira pilosicoli* di origine aviare rispetto a quelli inoculati con il ceppo di origine suina (tabella n.3). In alcuni di questi, la colonizzazione della mucosa era così intensa che l'orletto a spazzola risultava intensamente basofilo. Altre volte, nel punto ove i batteri si ancoravano alle cellule epiteliali sottostanti, era possibile osservare un rigonfiamento simile ad una piccola protuberanza, portante sulla sommità gruppi di brachispire disposte a palizzata. Nella sottostante lamina propria non si osservano quadri infiammatori.

Conclusioni

Ai fini della valutazione della patogenicità dei tre differenti ceppi di brachispire si devono considerare:

- I dati clinici di campo
- I fenomeni clinici dei soggetti S.P.F. della prova: non è stata rilevata alcuna sintomatologia clinica caratteristica.
- Il peso medio dei soggetti prelevati da ciascuna unità isolante: nei pulcini infettati con *Brachyspira intermedia* è stato possibile registrare una netta differenza di peso rispetto al gruppo di controllo al 2° e 3° prelievo (vedi tabella n.1)
- le lesioni anatomopatologiche: nei soli pulcini infettati con *Brachyspira intermedia* l'esame

Tabella 3. *Brachyspira pilosicoli* suina e *Brachyspira pilosicoli* aviare riscontrate all'esame istologico

Table 3. Swine *Brachyspira pilosicoli* and avian *Brachyspira pilosicoli* to detected by histological test

Giorni P.I.	N. di animali	GRUPPO A		GRUPPO B		GRUPPO C	
		Int. tenue	Int. cieco	Int. tenue	Int. cieco	Int. tenue	Int. cieco
7	5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	5/5
14	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5
27	5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	5/5

autoptico ha consentito di evidenziare, a partire dal 2° prelievo, carni scure, ciechi dilatati con contenuto fluido acquoso mentre non sono state osservate lesioni caratteristiche nel gruppo di controllo

- la capacità di colonizzazione del germe: è risultata massima per *Brachyspira pilosicoli* e *Brachyspira intermedia* di origine aviare, inferiore per *Brachyspira pilosicoli* di origine suina, nel cui gruppo si è osservato un decremento del numero di soggetti infetti nel progredire della sperimentazione (vedi tabella n.2).
- le caratteristiche istologiche: non sono stati osservati quadri infiammatori nei tratti di intestino tenue e cieco degli animali esaminati. Le brachispire sembrano localizzarsi selettivamente sull'orletto a spazzola dei ciechi.

Le brachispire possono determinare alterazioni produttive nel pollo, soprattutto nei riproduttori e nelle galline ovaiole, come testimoniato dai due casi clinici da cui provengono i ceppi di brachispire di origine aviare in esame. L'infezione sperimentale ha dimostrato che la localizzazione del battere avviene e perdura nel tempo maggiormente per le brachispire di origine aviare rispetto al ceppo di origine suina. E' stato inoltre possibile osservare una netta riduzione di peso medio rispetto ai controlli nel gruppo infettato con *Brachyspira intermedia*. Resta da chiarire l'effettivo ruolo patogeno (primario o secondario) di questi microrganismi. Per questo motivo altri studi dovranno essere condotti direttamente in campo al fine di controllare le brachispire ed i danni da esse provocati.

Bibliografia

1. Dwars R.M., Smitt H.F., Davelaar F.G. (1990) Observations on avian intestinal spirochaetosis. Veterinary Quarterly 12:51-55
2. Hampson D.J., McLaren A.J. (1999) Experimental infection of laying hens with *Serpulina intermedia* causes reduced egg production and increased faecal water content. Avian Pathology 28: 113-117
3. Meriardi G., Bonilauri P., Calzolari M., Luppi A., Dottori M. (2003) First confirmation of avian intestinal spirochaetosis by *Brachyspira pilosicoli* in layer breeders in Italy. Submitted for publication to Veterinary Record, July.
4. Muniappa N., Duhamel G.E., Mathiesen M.R., Bargar T.W. (1996) Light microscopic and ultrastructural changes in the ceca of chicks inoculated with human and canine *Serpulina pilosicoli*. Vet. Pathol. 33:542-550
5. Smith H.F., Dwars R.M., Davelaar F.G., Wijten W. (1998) Observations on the influence of intestinal spirochaetosis in broiler breeders on the performance of their progeny and on egg production. Avian Pathology 27:133-141
6. Stephens C.P., Hampson D.J. (1999) Prevalence and disease association of intestinal spirochaetes in chickens in eastern Australia. Avian Pathology 28:447-454
7. Stephens C.P., Hampson D.J. (2002) Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* causes reduced egg production. Avian Pathology 31: 169-175

COMUNICAZIONE 20

SVILUPPO, VALIDAZIONE E STANDARDIZZAZIONE DI UN TEST ELISA COMPETITIVO PER LA RICERCA DEGLI ANTICORPI CONTRO LA MALATTIA DI NEWCASTLE

A. Toffan, A. Zuin, D. Buson, B. Tramontan, I. Capua

Area Sanità Animale, Laboratorio di virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: ELISA competitivo, NDV, HI, SN

Development, validation and standardization of a competitive ELISA for the detection of antibodies against Newcastle disease

Key words: competitive ELISA, NDV, HI, SN

Summary: Newcastle disease (ND) is regarded throughout the World as one of the most important disease of poultry and for this reason is included as an OIE list A disease. In the present paper 680 sera of chicken and 690 sera of turkey were tested for ND by inhibition of haemoagglutination test (gold standard for these two species) and by ELISA and 326 sera of ostrich were tested by seroneutralization test (gold standard for this species) and by ELISA. The results of the different tests were compared in order to detect the test with best specificity and sensibility. The data obtained show that ELISA has good values of sensibility and specificity, moreover ELISA is fast and easy to perform and for these reasons it could be very useful for routinely diagnostic use.

Correspondence: Anna Toffan, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD) e-mail: virologia@izsvenezie.it

Introduzione

La malattia di Newcastle (ND) o pseudopeste aviare è una delle patologie più diffuse a livello mondiale nonché una delle maggiori cause di perdite per le specie aviarie, raggiungendo nelle specie sensibili picchi di mortalità superiori al 50%. Il virus responsabile della malattia è un *Paramyxovirus* tipo 1 appartenente al genere *Avulavirus*, famiglia dei *Paramyxoviridae* ordine dei *Monegavirales*.

La malattia è inclusa nella Lista A dell'Office International des Epizooties (OIE) e al riguardo sono state emanate specifiche misure di legge in tutta la comunità europea (92/66/CEE), recepite in Italia dal DPR 657/96.

L'indagine sierologica è il principale metodo utilizzato per evidenziare la presenza di anticorpi specifici nel siero, in particolare con i test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) e di siero neutralizzazione (SN). Il test ELISA in esame si propone come valida alternativa ai tradizionali test anche per specie diverse da pollo e tacchino.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati 1696 sieri di cui 680 di pollo (*Gallus gallus*), 690 di tacchino (*Meleagris gallopavo*) e 326 di struzzo (*Struthio camelus*). I sieri utilizzati sono stati scelti tra quelli inviati per accertamenti al laboratorio di virologia aviare dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie.

L'antigene virale è stato prodotto, purificato e conservato nei laboratori dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie.

E' stato utilizzato un anticorpo monoclonale specifico per il ceppo virale utilizzato: U85 proveniente dai laboratori di virologia di Weybridge (Veterinary Laboratories Agency UK).

Come antisiero specifico per il Mab è stato utilizzato un anticorpo marcato con idrogeno perossidasi (HPR) di topo prodotto dalla ICN Biomedicals Inc.

Sono state utilizzate piastre a 96 pozzetti del tipo Nunc Products Immuno Plate TM Polysorp Surface (Denmark Production).

Ogni campione è stato testato su due pozzetti, la media matematica delle densità ottiche (OD) dei due pozzetti trasformata in percentuale di inibizione (PI) è stata considerata come risultato finale.

I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti alle prove di HI per pollo e tacchino e di SN per lo struzzo (in quanto per questa specie l' HI non è una prova attendibile (1,3,8), allo scopo di ottenere: cut-off, correlazione (K) tra i due test, sensibilità (Se) e specificità (Sp) relativa (4,2,5).

Inoltre sono state effettuate prove di riproducibilità, ripetibilità del test e stabilità delle piastre congelate.

Risultati

Per la specie pollo, con una soglia di cut-off (in PI) pari a 50 si ottiene una sensibilità di 91,76%, una specificità di 92,27% e una concordanza al test dell'HI di 0,837 (che corrisponde ad una concordanza quasi perfetta tra i test (7).

Per la specie tacchino, con una soglia di cut-off (in PI) pari 25 si ottiene una Se di 97,01% e una Sp di 83,49% e una concordanza tra al test dell'HI di 0,772 (che corrisponde ad una sostanziale concordanza tra i test (7).

Per la specie struzzo con una soglia di cut-off (in PI) pari a 10 si ottiene una Se di 46,41% e una Sp di 91,67% e una concordanza al test dell'SN di 0,4 (che corrisponde ad una moderata concordanza tra i test (7).

Le prove effettuate sulle piastre congelate hanno confermato la possibilità di adsorbire in anticipo e conservare a -20°C le piastre per almeno 180 giorni.

Le prove di ripetibilità hanno fornito valori in coefficiente di variazione (CV) compresi tra 4 e 8%.

Le prove di riproducibilità hanno fornito valori in coefficiente di variazione (CV) compresi tra 7 e 21% (6)

Discussione

Esistono numerosi test di laboratorio in grado di evidenziare la presenza di anticorpi (Ab) specifici per NDV nel siero. Tra tutti l'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) è probabilmente il più utilizzato perché rapido e di semplice esecuzione, tanto da essere diventato l'unico metodo di referenza per questa malattia. Tuttavia l'inibizione dell'emoagglutinazione presenta dei limiti, principalmente per quanto riguarda la standardizzazione della prova nei diversi laboratori. Inoltre non è noto se è in grado di rivelare anticorpi

anti-ND in tutte le specie. Infine alcuni sieri possono contenere emoagglutinine aspecifiche attive sui globuli rossi di pollo che possono invalidare la prova.

Per questo il test sicuramente più utile è la sieroneutralizzazione (SN) in quanto la presenza del virus vivo fornisce informazioni, non solo sulla presenza di anticorpi, ma anche sulla loro reale capacità protettiva per l'animale vivo nei confronti della malattia. La sieroneutralizzazione però è una prova indagativa: richiede tempi di realizzazione lunghi, materiale idoneo e sterile, e tecnici di laboratorio specializzati.

Proprio per questi motivi negli ultimi anni si è andata sviluppando la ricerca di un nuovo test sensibile, ma anche di facile e rapida esecuzione. I test ELISA rispondono a tutte queste caratteristiche ed in più hanno dimostrato di essere facilmente confrontabili con l'inibizione dell'emoagglutinazione, che rimane comunque il test di riferimento.

Un ulteriore passo in avanti è stato la produzione di anticorpi monoclonali (Mab) (6) specifici per PMV-1 in modo da poter sviluppare un test ELISA di tipo competitivo. Quest'ultimo test presenta il vantaggio di non avere i limiti di specie-specificità dei test immunoenzimatici tradizionali, e quindi di poter essere utilizzato indifferentemente con il siero proveniente da qualsiasi specie aviaria. Inoltre il test ELISA competitivo poiché utilizza il virus *in toto* adsorbito alla piastra presenta una maggiore sensibilità in quanto rileva gli anticorpi contro tutti gli epitopi virali e non solo quelli inibenti l'emoagglutinazione.

Il test ELISA competitivo oggetto della seguente tesi si è dimostrato un test di semplice e rapida esecuzione nonché dotato di elevata riproducibilità e ripetibilità. La possibilità di utilizzare le piastre congelate (che si sono dimostrate stabili per almeno 180 giorni) ne aumenta ulteriormente la semplicità di applicazione.

La flessibilità del test, inoltre, permette di adattarlo alle diverse esigenze che variano a seconda della situazione epidemiologica della regione in cui viene usato. Infatti al variare dei valori di cut off si ottengono per ogni specie dei valori diversi di sensibilità e specificità. Questo permette di poter scegliere la soglia di cut off a seconda dell'obiettivo dell'indagine. Per esempio qualora un paese indenne volesse importare volatili da un paese endemico si potrebbe abbassare la soglia del cut off (cioè aumentare la sensibilità) in modo da evidenziare ogni animale positivo per la presenza di anticorpi (infetto o vaccinato). Al contrario se l'importazione avvenisse tra paesi endemici bisognerebbe alzare la soglia di cut off (aumentare la specificità) al fine di accertare che tutti gli animali siano stati vaccinati e abbiano risposto in modo adeguato all'intervento vaccinale.

Per questo l'ELISA competitiva risulta particolarmente adatto a testare in tempi brevi elevati numeri di campioni oppure come "screening di massa" per

caratterizzare dal punto di vista immunologico una popolazione di animali.

Data la rigida legislazione in materia, la possibilità di sfruttare in questo modo un test diagnostico può consentire ai paesi importatori un notevole risparmio in tempo e denaro.

La semplicità di esecuzione e di produzione dei reagenti e la possibilità di ottenere il Mab da una fonte accreditata (Centro di Riferenza Comunitario) indica che questo test potrebbe essere applicato per la diagnosi di NDV nel territorio dell'UE oltre che nei paesi terzi che hanno scambi commerciali con i paesi dell'UE.

Il presente studio ha dimostrato inoltre la scarsa affidabilità del test dell'inibizione dell'emoagglutinazione per lo struzzo, specie che presenta peculiarità incompatibili con i normali test di laboratorio. Anche il test ELISA competitivo ha dovuto essere modificato e adattato a questa specie, ma il test di riferimento resta comunque la sieroneutralizzazione; sarà quindi necessario sviluppare metodi alternativi per la diagnosi di NDV nello struzzo.

Tale ELISA competitivo può essere utilizzato per la diagnosi di NDV anche in altre specie di volatili, anche se è necessario adattarlo ad ogni singola specie date le diversità osservate nel presente lavoro per pollo, tacchino e struzzo.

Bibliografia

1. Alexander, D.J. (2000) Newcastle Disease in ostriches (*Struthio camelus*) a review. *Avian Pathology* 29 pp 95-100
2. Brown, J.; Resurreccion, R.S. & Dickson, T.G. (1990) Correlation of haemoagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology* 34, 585-587
3. Cadman, H.F., Kelly, P.J., De Angelis, N.D., Rodhe, C., Collins, N. & Zulu, T. (1997) Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle Disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) *Avian Pathology* 26 pp 357-363.
4. Christensen J.; Garder A.I. (2000) Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal disease. *Preventive Veterinary Medicine* 45 pp 83-106
5. Cvelic-Cabrilo, V., Mazija, H., Bidin, Z. & Ragland, W. (1992) Correlation of haemagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to Newcastle disease virus. *Avian Pathology* 21 pp 509-512
6. Czifra, G., Nilsson, M., Alexander, D.J., Manvell, R., Keckesmeti, S. & Engstrom, B.E. (1996) Detection of PMV-1 specific antibodies with a monoclonal antibody blocking enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Pathology* 25 pp 691-703
7. Everitt, R.S. (1989) *Statistical Methods for Medical Investigation*. Oxford University Press. New York Edward Arnold London
8. Koch, G., Czifra, G. & Engstrom, B.E. (1998) Detection of Newcastle Disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. *Veterinary Record* 143:10-12.

COMUNICAZIONE 21

DIAGNOSI BATTERIOLOGICA E BIOMOLECOLARE DELLA COLIBACILLOSI NEL POLLO

D. Giovanardi¹, E. Campagnari¹, R. L. Sperati¹, G. Ortali², V. Furlattini², P. Pesente¹

¹Laboratorio Tre Valli. San Martino Buon Albergò, Verona

²AIA S.p.A. San Martino Buon Albergò, Verona

Parole chiave: APEC, fattori di virulenza, PCR

Bacteriological and biomolecular diagnosis of poultry colibacillosis

Keywords: APEC, virulence factors, PCR

Summary: The authors describe 13 cases of colibacillosis in Italy in seven breeder flocks and 7 cases in seven broiler flocks coming from three of them. The most significant lesions were peritonitis in breeders and omphalitis in broiler chicks. *Escherichia coli* was isolated from all the clinical cases and PCR was used to identify the virulence factors fimbriae type 1, type P, aerobactin and Tsh. These factors could give further information on the pathogenicity of the isolated *E.coli*.

Correspondence: Davide Giovanardi - Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina, 3; 37036 - San Martino Buon Albergò, Verona
Email: davide.giovanardi@AIA-spa.it

Introduzione

La colibacillosi è una delle principali cause di mortalità negli allevamenti avicoli con alte perdite economiche. I ceppi patogeni di *Escherichia coli* aviari (APEC, Avian Pathogenic *Escherichia coli*) causano una varietà di lesioni come polisierosite, aerosacculite, pericardite, peritonite, salpingite, sinovite, osteomielite e infezioni del sacco vitellino (4). La via di infezione più comune è quella respiratoria frequentemente seguita da setticemia (6). Sebbene *E.coli* sia presente nella normale microflora ambientale e del tratto intestinale del pollo, certi ceppi esprimono uno o più fattori di virulenza in grado di causare malattia (4). Storicamente la patogenicità dei ceppi APEC è stata ricercata mediante tipizzazione sierologica del ceppo isolato in quanto, a seconda degli autori, i sierotipi più frequentemente riscontrati (O1, O2, O78) erano presenti nel 15-61% dei casi di colibacillosi (1).

Negli ultimi anni sono state approfondite le conoscenze sui fattori di virulenza degli APEC dimostrando come essi utilizzino differenti meccanismi di azione rispetto agli *E.coli* responsabili delle forme enteriche dei mammiferi.

Tra i fattori di virulenza maggiormente studiati e documentati in bibliografia vi sono: le fimbrie di tipo 1 (3), il Tsh (Temperature-sensitive haemoagglutinin) (2), le fimbrie di tipo P e il sistema aerobactina (5).

Le fimbrie di tipo 1 e il Tsh sono dei fattori di adesione in grado di permettere la colonizzazione degli APEC alla trachea (fimbrie) ed ai sacchi aerei (Tsh).

La resistenza, nel torrente circolatorio, all'azione del complemento e alla fagocitosi macrofagica, è conferita dalle fimbrie di tipo P e dai lipopolisaccaridi capsulari (LPS). Il sistema aerobactina permette a *E.coli* di acquisire il ferro libero ematico che altrimenti non sarebbe presente in concentrazione sufficiente per la sua sopravvivenza.

La biologia molecolare ha individuato le sequenze geniche di questi fattori di virulenza e, con il presente lavoro, si intende caratterizzare con PCR (Polimerase Chain Reaction) la loro distribuzione in alcuni allevamenti del nord Italia considerando il loro valore diagnostico a supporto di quello fornito dalla batteriologia tradizionale.

Materiali e metodi

Campionamento

Durante il periodo Marzo 2003-Giugno 2003 sono stati presi in considerazione 20 casi clinici di colibacillosi: tredici casi in sette allevamenti di riproduttori (a, b, c,

d, e, f, g) e sette casi in sette allevamenti di broiler di età compresa tra uno e sette giorni di cui cinque casi provenienti dal riproduttore b, 1 caso proveniente da c, 1 caso proveniente da g. Inoltre, si è provveduto a testare la progenie di ogni riproduttore per la presenza di *E.coli* nel sacco vitellino di uova beccate non schiuse.

Isolamento batteriologico

L'isolamento di *E.coli* è stato ottenuto su EMB (Eosin Methylene Blue) agar (Oxoid) incubando le piastre per 24 ore a 37°C; l'identificazione è stata effettuata tramite le correnti tecniche biochimiche. La tipizzazione sierologica è stata eseguita con antisieri O1:K1, O2:K2 e O78:K80 (V.L.A. Weybridge).

Indagine biomolecolare

PCR Per l'analisi biomolecolare *E.coli* è stato propagato in terreno liquido EC (Difco) per 12 ore a 37°C. La ricerca dei fattori di virulenza è stata eseguita mediante PCR estraendo il DNA di *E.coli* con DNAzol (Invitrogen) e utilizzando primers specifici per la ricerca dei geni *fimC* (fimbrie tipo 1), *iucD* (aerobactina), *tsh* e *papC* (fimbrie tipo P) (4).

Risultati e discussione

Lesioni anatomopatologiche

Le lesioni anatomopatologiche, rilevate in sede necroscopica, erano in tutti i casi clinici riconducibili a peritonite, periepatite, aerosacculite toracica e, nei broiler, anche a pericardite e onfalite.

Isolamento batteriologico e sierotipizzazione

In totale sono stati isolati e tipizzati 103 ceppi di *Escherichia coli* dei quali 64 (62%) da visceri di riproduttori e broiler (rispettivamente 30% e 32%) e 39 (38%) dagli embrioni delle uova beccate non schiuse. Nella tabella 1 sono indicati in dettaglio le matrici organiche dove *E.coli* è stato isolato.

Tabella 1 Distribuzione *E.coli* isolato da visceri di riproduttori e broiler.

Table 1: Distribution of *E.coli* isolated from viscera in breeders and broiler chicks

	Cer	S.aer	Peric	S.vit	Feg	Mil	Ova
Rip.	23%	48%	0%	0%	7%	10%	10%
Bro.	30%	0%	18%	49%	3%	0%	0%

Legenda: Cer=cervello; S.aer=sacco aereo; Peric=pericardio; S.vit=sacco vitellino; Feg=fegato; Mil=milza; Ova=ovaio.

Dalla tabella 1 notiamo come la maggior parte di *E.coli* siano stati isolati da sacchi aerei (riproduttori) e da

sacco vitellino (broiler). La maggioranza degli *E.coli* risultavano essere sierologicamente non tipizzabili (58%), i restanti erano O78 (32%) e O2 (10%). In tabella 2 è specificata la distribuzione, in percentuale, dei sierotipi di *E.coli* isolati da visceri e uova beccate.

Tabella 2, Distribuzione sierotipi *E.coli*
Table 2. *E.coli* serotypes distribution

Sierot. <i>E.coli</i>	O78	NT	O2
Cervello	70%	30%	0%
S.aereo	13%	74%	13%
S.vitellino	75%	25%	0%
Pericardio	83%	17%	0%
Ovaio	0%	100%	0%
Milza	33%	77%	0%
Fegato	33%	77%	0%
U.beccate	0%	80%	20%

Legenda: NT - *E.coli* non tipizzabile

Dalla tabella si osserva come il sierotipo O78 sia maggiormente rappresentato tra i visceri indicativi di una setticemia fatale o di una onfalite in atto (cervello, pericardio e sacco vitellino).

La maggior parte degli *E.coli* isolati dalle uova beccate risulta invece essere non tipizzabile.

Nella tabella 3 sono descritti gli *E.coli*, in percentuale, maggiormente isolati per riproduttore, uova beccate e broiler in ciascuna filiera riproduttiva.

Tabella 3. Distribuzione sierotipi *E.coli* a seconda dell'origine

Table 3. *E.coli* serotypes distribution based on the different origin

Allevam.	Riproduttore	Uova bec.	Broiler
a	NT (75%)	NT (100%)	NE
b	O78 (100%)	NT (100%)	O78 (93%)
c	NT (60%)	NT (100%)	NT (100%)
d	NT (100%)	NT (100%)	NE
e	O2 (100%)	O2 (100%)	NE
f	NT (50%)	NT (100%)	NE
g	NT (75%)	NT (78%)	NT (100%)

Legenda: NT: *E.coli* non tipizzabile ; NE : non eseguito

Dalla tabella si dimostra come vi sia una relazione tra i sierotipi di *E.coli* maggiormente presenti nei riproduttori e quelli isolati nella loro progenie (uova beccate e broiler).

PCR

La ricerca dei fattori di virulenza precedentemente descritti, è stata eseguita su tutti i 103 ceppi di *E.coli* isolati. Le percentuali di positività sono le seguenti: Fimbrie di tipo 1 (95%), sistema aerobactina (78%), Tsh (62%) e fimbrie tipo P (4%).

Nella tabella 4 sono descritti in dettaglio le percentuali di positività per i geni dei fattori di virulenza per ogni sierotipo di *E.coli* isolato.

Tabella 4. Distribuzione fattori di virulenza per sierotipo di *E.coli*

Table 4. *E.coli* virulence factors distribution

	O78	NT	O2
Fim C	100%	91%	100%
lucD	91%	72%	70%
Tsh	91%	40%	100%
Pap C	3%	5%	0%

Legenda: *FimC*-gene fimbrie tipo 1; *lucD*-gene sistema aerobactina; *Tsh*-gene della Temperature-sensitive haemoagglutin; *PapC*-gene fimbrie tipo P

Come si evince dalla tabella 4 i sierotipi O78 e O2 presentano ciascuno la più alta percentuale di positività per due fattori di virulenza su quattro (*FimC*, *lucD* per O78 e *FimC* e *Tsh* per O2), indicando come questi sierotipi siano potenzialmente patogeni.

Nella tabella 5 sono distribuite in percentuale le positività per ogni fattore di virulenza isolato da visceri e uova beccate.

Tabella 5. Distribuzione fattori di virulenza in percentuale da visceri e uova beccate

Table 5. *E.coli* virulence factors distribution from viscera and eggs

	<i>luc D</i>	<i>Tsh</i>	<i>FimC</i>	<i>PapC</i>
Cervello	76%	70%	100%	18%
S.aereo	66%	53%	93%	6%
S.vitellino	100%	94%	100%	0%
Pericardio	100%	100%	100%	0%
Uova becc.	69%	43%	90%	0%

Dalla tabella 5 si nota come il pericardio ha la più alta percentuale di positività per tre fattori di virulenza su quattro (*FimC*, *lucD*, *Tsh*) seguito da cervello (*FimC*, *PapC*) e da sacco vitellino (*lucD*, *FimC*) con due. Per quanto riguarda il cervello notiamo la più alta positività per il gene *Pap C*.

In particolare abbiamo rilevato come la positività di *E.coli* per i tre fattori combinati *lucD*, *Tsh*, *FimC*, che ne individua un patotipo, è indice di elevata patogenicità in quanto riscontrata nei ceppi isolati da pericardio (100%), sacco vitellino (81%), cervello (65%) e sacco aereo (53%).

La colibacillosi è spesso condizionata nel suo andamento da altri fattori di tipo ambientale ed infettivo; per questo riteniamo che il patotipo possa fornire valide indicazioni sulla reale patogenicità dei ceppi di *E. coli* sierotipizzabili e non.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Lothar H. Wieler, Institut fur Microbiologie und Tierseuchen, Freie Universitat, Berlin per aver fornito i ceppi di referenza. Si ringraziano i Sig. Marchi M., Margonari C. e Polinari S. per la preziosa collaborazione tecnica offerta.

Bibliografia

- Dho-Moulin M. et al. (1999); Avian pathogenic Escherichia coli (APEC); Vet. Res. 30: 299-316
- Dozois C. M. et al. (2000); Relationship between the Tsh autotransporter and Pathogenicity of avian Escherichia coli Localization and analyses of the tsh Genetic Region; Infection and Immunity 68: 4145-4154
- Dozois C.M. et al. (1993); Bacterial Colonization and in vivo Expression of F1 (Type 1) Fimbrial antigens in Chickens Experimentally Infected with Pathogenic Escherichia coli; Avian Diseases 38: 321-329
- Jan Ben T. et al. (2001); Virulence-associated genes in avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis; Int. J. Med. Microbiol. 291: 371-378
- Ngeleka M. et al. (2002); Pathotypes of avian Escherichia coli as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissue and the cloacae of broilers; Avian Diseases 46: 143-152
- Pourbackhsh S.A. et al. (1997); Dynamics of Escherichia coli Infection Experimentally Inoculated Chickens; Avian Diseases 41: 221-223

COMUNICAZIONE 22

VARIABILITA' GENETICA ED EPIDEMIOLOGIA DEGLI APEC LUNGO LA FILIERA AVICOLA

E. Campagnari¹, R. L. Sperati¹, P. Pesente¹, G. Ortali², V. Furlattini², D. Giovanardi¹

¹Laboratorio Tre Valli. San Martino Buon Albergò, Verona

²AIA S.p.A. San Martino Buon Albergò, Verona

Parole chiave: APEC, fattori di virulenza, PCR, RAPD

APEC genetic variability and epidemiology in the avian production chain

Keywords: APEC, virulence factors, PCR, RAPD

Summary: The authors perform an epidemiological study that shows the APEC transmission from breeder to the broiler chicks could be possible and speculate the reason why from onfalitis the pathogenic strain has never been isolated.

Correspondence: Evelyn Campanari, Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina, 3; 37036 - San Martino Buon Albergò, Verona
Email: Evelyn.campagnari@aia-spa.it

Introduzione

La caratteristica di *E. coli* in tutte le specie animali, compreso l'uomo, è quella di far parte, in gran numero, della normale flora batterica intestinale (ceppi commensali) e di essere la causa, in un numero limitato di ceppi, di infezioni intestinali od extra-intestinali (ceppi patogeni). A questo ultimo gruppo appartengono gli APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*).

E' quindi fondamentale l'uso di un efficiente metodo di differenziazione dei ceppi commensali da quelli patogeni: la tradizionale sierotipizzazione dei ceppi isolati, i test di sensibilità e, negli ultimi anni, i fattori di virulenza, forniscono numerose informazioni per la diagnostica ma non sufficienti per lo studio epidemiologico della malattia.

E' stato ad esempio dimostrato che ognuno dei sierogruppi prevalenti O1, O2, O78 è composto da cloni geneticamente diversi (9). Forse, anche per quanto sopra esposto, in bibliografia numerosi sono i riferimenti agli agenti infettivi predisponenti la colibacillosi (es. *Mycoplasma gallisepticum*, virus della bronchite infettiva) mentre solo in pochi lavori è stata approfondita l'epidemiologia degli APEC e le azioni da intraprendere per prevenire e controllare la colibacillosi. In genere i metodi che differenziano il genotipo come la RAPD (1) (6) sono considerati più discriminatori dei metodi fenotipici e la combinazione dei dati dà le informazioni più complete.

La tecnica della RAPD si basa sul principio per cui un singolo oligonucleotide, scelto arbitrariamente, può appaiarsi in siti diversi del genoma su entrambi i filamenti del DNA; se questi distano non più di qualche kb tra loro la regione genica compresa tra essi può essere amplificata. Poiché questo appaiamento avviene in modo casuale più volte nel genoma, si ottiene un profilo di fingerprinting specifico per specie o ceppo.

Alcuni studi hanno valutato le relazioni genetiche tra ceppi patogeni isolati da casi di colisetticemia (3) o da casi di Swollen Head Syndrome, onfaliti e commensali (2) ma non risultano studi su ceppi di *E. coli* provenienti da casi di colibacillosi lungo la filiera riproduttore-incubatoio-ingrasso.

Materiali e metodi

Campionamento

Durante il periodo Marzo 2003-Giugno 2003 sono stati presi in considerazione 20 casi clinici di colibacillosi:

- tredici casi in sette allevamenti di riproduttori (a-g).
- sette casi in sette allevamenti di broiler di età

compresa tra uno e sette giorni di cui cinque (b1, b2, b3, b4, b5) provenienti dal riproduttore b.

- un caso (c1) proveniente da c e un altro (g1) da g.
- Inoltre, si è provveduto a testare la progenie di ogni riproduttore a livello di incubatoio per la presenza di *E. coli* nel sacco vitellino in uova beccate non schiuse. Le filiere sono identificate con le lettere da A a G

Tipizzazione sierologica

La tipizzazione sierologica è stata eseguita con antisieri O1:K1, O2:K2 e O78: K80 (V.L.A. Weybridge).

Ricerca dei fattori di virulenza

Eseguita secondo quanto descritto in precedenza (4).

RAPD

Il *E. coli* è stato propagato in terreno liquido EC (Difco) per 12 ore a 37°C. La RAPD è stata eseguita su 20 ng di DNA estratto con DNAzol Reagent (Invitrogen) usando il kit Ready-To-Go (Amersham Bioscience) e i primers 1290 (6) e 6 (1). Il prodotto della reazione è stato visualizzato su gel al 2% di agarosio in TAE, colorato con etidio bromuro e l'immagine è stata acquisita con GelDoc 2000 (Biorad). Il pattern elettroforetico è stato analizzato con Gel Compare II versione 2.0 (Applied Maths).

Risultati e discussione

I dati ottenuti dall'indagine epidemiologica mediante RAPD sono in parte evidenziati in Figura 1. Il dendrogramma, pur evidenziando la presenza di ceppi di *E. coli* diversi nell'ambito della stessa filiera, ha indicato chiaramente la presenza di cloni. Le elevate omologie per i fattori di virulenza e per i pattern di antibiotico-resistenza di questi cloni, confermano i risultati della RAPD:

Tabella 1. Sierotipo e % positività dei fattori di virulenza dei cloni in filiera C

Table 1: Serotype and % of virulence factors' positivity of clones in line C

	Sier.	IudC	Tsh	FimC	Papc
Rip.	NT	100%	0%	100%	0%
Broil.	NT	100%	0%	100%	0%

Tabella 2. Sierotipo e % positività fattori di virulenza dei cloni in filiera E

Table 2. Serotype and % of virulence factors' positivity of clones in line E

	Sier.	IudC	Tsh	FimC	Papc
Rip.	O2	100%	100%	100%	0%
U.becc.	O2	100%	100%	100%	0%

Tabella 3. Sierotipo e % positività fattori di virulenza dei cloni in filiera B

Table 3. Serotype and % of virulence factors' positivity of clones in line E

	Sier.	ludC	Tsh	FimC	Papc
Rip.B	O78	100%	100%	100%	0%
Bro.B.	O78	96%	96%	100%	0%

Legenda: FimC-gene fimbrie tipo 1; ludC-gene sistema aerobactina; Tsh-gene della Temperature-sensitive haemoagglutin; PapC-gene fimbrie tipo P

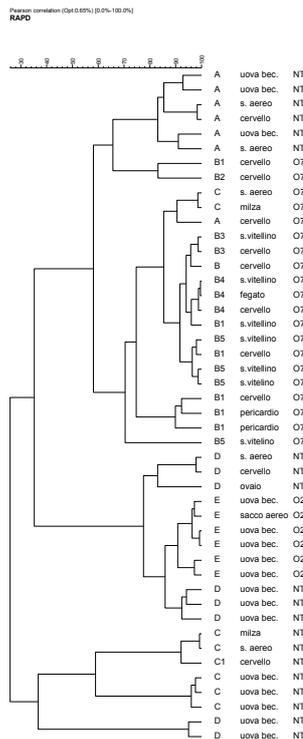


Figura 1. Albero filogenetico di E.coli generato con RAPD. Legenda: Nelle tre colonne da sinistra a destra sono indicati: allevamento, origine e sierotipo degli isolati di E.coli utilizzati per la RAPD

Figure 1. Phylogenetic tree of E.coli generated with RAPD

In letteratura è stata dimostrata sperimentalmente la trasmissione di *E. coli* non patogeno tra riproduttore e broiler al momento della schiusa attraverso la via respiratoria (7). Non è trascurabile, ai fini epidemiologici, che da *E. coli* isolati da onfaliti non siano stati ritrovati ceppi patogeni per l'embrione (2). In questo studio, analogamente a quanto indicato per lo *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (5), anche se sono previste ulteriori indagini a completamento della ricerca, sono emersi elementi in grado di ipotizzare la possibilità di trasmissione di *E. coli* patogeno dai riproduttori ai broiler; questa potrebbe avvenire verticalmente oppure per penetrazione di *E. coli*

all'interno dell'uovo a causa di una contaminazione fecale del guscio.

Il ritrovamento lungo la filiera dello stesso clone, come evidenziato in questo studio, ed il mancato ritrovamento di ceppi patogeni in casi di onfaliti, come segnalato in letteratura, potrebbe essere spiegato dal fatto che solo gli embrioni infetti con *E. coli* apatogeni o con un numero estremamente limitato di ceppi patogeni giungerebbero alla schiusa; di conseguenza il loro isolamento sarebbe difficoltoso. Per le loro caratteristiche di patogenicità gli APEC potrebbero successivamente moltiplicarsi e diffondersi attraverso la via respiratoria oppure, dal sacco vitellino, dare setticemia.

Un'altra ipotesi nascerebbe dal fatto che cloni non patogeni possono acquisire fattori di patogenicità; la presenza di plasmidi (es: Colicin V) o "high-pathogenicity island" potrebbe spiegare il rapido ed efficiente trasferimento di fattori di virulenza. L'acquisizione, il mantenimento o l'espressione dei geni di virulenza sembrerebbe avvenire più facilmente in ceppi con un particolare background genetico evidenziato, ad esempio, dalla similarità alla RAPD (8).

In conclusione, gli strumenti diagnostici utilizzati in questo studio, ci forniscono connessioni epidemiologiche più chiare tra riproduttori e broiler e danno maggiore rilevanza pratica al controllo dell'antibiotico-resistenza nei riproduttori, al miglioramento delle condizioni igieniche delle uova e, in ultima analisi, alle informazioni tempestive tra le fasi di riproduzione e di ingrasso che possono incidere sulla salute della progenie.

Bibliografia

1. Chansiripornchai N. et al. (2001); Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis; Veterinary Microbiology 80: 75-83
2. da Silveira W. D. et al. (2003); Determination of the Clonal structure of Avian *Escherichia coli* strains by Isoenzyme and Ribotyping analysis; J. Vet. Med. 50: 63-69
3. de Moura et al. (2001); Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction; Avian Diseases 45: 173-181
4. Giovanardi D. et al. (2003); Diagnosi batteriologica e biomolecolare della colibacillosi nel pollo; Atti Convegno Società Italiana Patologia Aviaria
5. Glavits R. et al. (1983); Pathological studies in chicken embryos and day-old chicks experimentally infected with *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*; Acta Veterinaria Hungarica 32:39-49
6. Maurer J.J. et al. (1998); Molecular Typing of Avian *Escherichia coli* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA; Avian Diseases 42:431-451
7. Montgomery R. D. et al. (1988); Consequences to Chicks hatched from *Escherichia coli* inoculated embryos; Avian Diseases 43:553-563
8. Picard B. et al. (1998); The link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection
9. White D.G. et al (1993); Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin; microbial Pathogenesis 14: 399-409

COMUNICAZIONE 23

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ROTAVIRUS IDENTIFICATI IN CORSO DI FOCOLAI DI ENTERITE TRASMISSIBILE DELLA STARNA (*PERDIX PERDIX*): RISULTATI PRELIMINARI

M. Battilani¹, M.V. Murgia¹, A. Lavazza², M. Cecchinato¹, E. Catelli¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Parole chiave: rotavirus, elettroferotipi, tipizzazione molecolare, starna, enterite

Molecular characterization of rotavirus found during outbreaks of transmissible enteritis in Grey partridge (*Perdix perdix*): preliminary results

Key words: rotavirus, electropherotypes, molecular characterization, grey partridge, enteritis

Summary: Electrophoretic analysis (PAGE) of the viral dsRNA was carried out on intestinal samples of grey partridge chicks experiencing transmissible enteritis and found to be positive by electron microscopy for rotavirus. The samples were obtained from three game farms sited in the North of Italy, and in one of them, repeated outbreaks occurred in different years. PAGE produced eleven bands arranged in the typical "short pattern". All the samples examined, apart from farms or years of sampling, showed an identical electrophoretic pattern suggesting that a specific electropherotype of rotavirus had affected this avian species. This preliminary conclusion needs to be confirmed by further research.

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

Introduzione

I Rotavirus sono virus a RNA responsabili di gravi patologie post-natali in mammiferi ed uccelli; le enteriti da rotavirus vanno assumendo un ruolo preminente negli allevamenti avicoli a causa delle significative perdite economiche che determinano (6).

La presenza di rotavirus in corso di infezioni enteriche nella starna è stata evidenziata alla microscopia elettronica alla fine degli anni '80 (2, 6). Forme di enterite trasmissibile, causa di elevata mortalità nella prima settimana di vita, verosimilmente riferibili alla stessa eziologia, erano state già precedentemente segnalate (3, 7) in allevamenti di starni a scopo di ripopolamento. Nell'ambito dei rotavirus vengono distinti 7 sierogruppi (A, B, C, D, E, F, G) sulla base delle caratteristiche antigeniche della proteina capsidica VP6 e numerosi elettroferotipi sulla base della mobilità elettroforetica degli 11 segmenti di RNA a doppia catena (dsRNA) (1). I dati relativi alle caratteristiche antigeniche e genomiche dei rotavirus aviari sono scarsi, soprattutto a causa delle difficoltà nell'adattare in coltura cellulare tali ceppi che appartengono in prevalenza al gruppo non-A, per cui ai fini di uno studio approfondito delle caratteristiche di tali virus si rende necessario il ricorso a metodiche biomolecolari. L'elettroforesi in condizioni denaturanti permette la caratterizzazione preliminare dei rotavirus mediante l'analisi dei profili di migrazione elettroforetica degli 11 segmenti di dsRNA (8, 9). La presenza di differenti profili elettroforetici dipende dal riassortimento genico tipico dei virus a genoma segmentato. L'analisi accurata degli elettroferotipi consente di effettuare indagini epidemiologiche e di individuare la presenza di eventuali ceppi endemici.

Il presente lavoro riporta i risultati dell'analisi elettroforetica svolta su ceppi di rotavirus identificati in focolai di enterite trasmissibile della starna allo scopo di individuare gli elettroferotipi circolanti in tale specie.

Materiali e Metodi

Campioni. Sono stati esaminati intestini provenienti da 3 allevamenti di starni (A, B, C) situati in diverse province del Nord Italia in corso di focolai di enterite trasmissibile. I campioni dell'allevamento A sono relativi a focolai ripetuti dal 2000 al 2002 (Tabella 1).

Tabella 1: Campioni esaminati

Table 1: Examined samples

Anno	Campione	Allevamento (provincia)	
2000	723/02	A	(Modena)
2001	891/01	A	(Modena)
2001	630/02	A	(Modena)
2001	1460/01	A	(Modena)
2002	403/02	A	(Modena)
2002	405/02	A	(Modena)
2002	508/02	A	(Modena)
2002	484/03	B	(Pavia)
2002	714/02	C	(Verona)

I soggetti colpiti avevano un'età compresa tra 3 e 7 giorni e presentavano depressione del sensorio, ali abbassate, tendenza a rimanere immobili e diarrea acquosa. All'esame anatomico-patologico si osservava dimagrimento e disidratazione notevoli, intestino tenue ectasico, con contenuto sieroso o catarrale e materiale alimentare indigerito. I ciechi si mostravano notevolmente ectasici per la presenza nel lume di liquido di color giallo-nocciola con grosse bolle di gas (Figura 1).

Figura 1. Starnotto con enterite trasmissibile: notevole ectasia dei ciechi e dell'ansa duodenale

Figure 1. Young grey partridge with transmissible enteritis: remarkable ectasia of caeca and duodenum



1
2
3
4
5

Microscopia elettronica. I campioni sono stati allestiti utilizzando la ~~7,8,9~~ tecnica Airfuge comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia 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 (5).

Estrazione RNA virale. L' RNA a doppia catena dei Rotavirus è stato estratto dai pool intestinali utilizzando un Kit del commercio, l'RNeasy Mini Kit (Qiagen) attenendosi alle indicazioni della ditta fornitrice. Brevemente, gli intestini ancora congelati sono stati sminuzzati con mortaio e pestello, 30 mg del tessuto omogenato sono stati trattati con 600 µl di un buffer di lisi contenente β-mercaptoetanololo. Dopo trattamento del campione con 600 µl di etanolo al 70% la soluzione è stata trasferita nella "RNeasy mini spin column" e sottoposto ad una serie di lavaggi con specifici buffers. L' RNA virale è stato eluito in 50 µl di acqua RNasi free e precipitato in etanolo. Il dsRNA così trattato è stato stoccato a -80°C fino al momento del suo utilizzo.

Elettroforesi dell'RNA virale. Il dsRNA virale preventivamente denaturato è stato sottoposto ad elettroforesi in gel di poliaccrilamide in condizioni denaturanti (PAGE) (8). Cinque µl di RNA, miscelati con un buffer denaturante costituito da 5 µl di formamide e 5 µl di TBE-urea sample buffer (Invitrogen), sono stati sottoposti a trattamento termico a 70°C per 10 minuti. L'elettroforesi è stata condotta a 200V per 4-5 ore in gel di acrilamide al 6% - 6M di urea.

Risultati

La microscopia elettronica ha evidenziato la presenza di rotavirus in tutti i campioni esaminati (Figura 2).

L'elettroforesi dell'RNA virale ha evidenziato un unico elettroferotipo comune a tutti i campioni esaminati. Gli 11 segmenti di dsRNA sono divisi in quattro gruppi in base al peso molecolare: gruppo I (segmenti 1-2-3-4), gruppo II (segmenti 5-6), gruppo III (segmenti 7-8-9), gruppo IV (segmenti 10-11). Sulla base della mobilità di migrazione elettroforetica dei segmenti 10-11 l'elettroferotipo evidenziato nella starna appartiene allo "short pattern" (4) (Figura 3).

Discussione

L'analisi elettroforetica condotta su ceppi di rotavirus identificati in corso di focolai di enterite trasmissibile, ha consentito di evidenziare il profilo genomico dell'RNA virale consistente di 11 segmenti migrati in quattro distinte regioni del gel in accordo con i relativi pesi molecolari. Il profilo elettroforetico è risultato uguale in tutti i ceppi esaminati indipendentemente dall'anno di occorrenza e dall'allevamento di provenienza. Sebbene non sia definita una correlazione tra il pattern elettroforetico dell'RNA e le caratteristiche antigeniche dei rotavirus, il fatto di avere identificato un unico elettroferotipo ci porta ad ipotizzare che la starna sia colpita da un rotavirus specifico. Ulteriori indagini permetteranno di confermare o meno tale ipotesi.

Bibliografia

1. Estes M.K., Cohen J. (1989). "Rotavirus gene structure and function". Microbiology Review, 53, 410-449.
2. Gough R.E., Collins M.S., Alexander D.J., Cox W.J. (1990). "Viruses and virus-like particles detected in samples from diseased game birds in Great Britain during 1988". Avian Pathology, 19, 331-342.

3. Govoni S., Maestrini N. (1979). "Considerazioni sulle forme morbose dell'avifauna allevata intensivamente allo scopo venatorio, riscontrate presso l'Istituto di Patologia Aviare di Bologna nel periodo 1/8/1976 - 31/8/1978". La Clinica Veterinaria, 102(4), 309-314.
4. Kalica A.R., Greenberg H.B., Espejo R.T., Flores J., Wyatt R.G., Kapikian A.Z., Chanock R.M. (1981). "Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2". Infection and Immunity, 33(3), 958-961.
5. Lavazza A., Pascucci S., Gelmetti D. (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. Vet Rec, 126(23), 581.
6. Pascucci S., Gelmetti D., Sironi G., Lavazza A. (1989). "Sindromi enteriche dei volatili da reddito: esperienze di campo e rilievi di microscopia elettronica". Atti della giornata di studio su: "Chicken Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili", Brescia, 23 giugno 1989. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, pp. 55-87.
7. Redon, P., Tournut, J. (1973). "L'enterite transmissible du jeune perdreau". Revue de Médecine Vétérinaire, 124 (6), 743-756.
8. Todd D., Mc Nulty M.S., Allan G.M. (1980). "Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Avian Rotavirus RNA". Archives of Virology, 63, 87-97
9. Todd D., Mc Nulty (1986). "Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels". Avian Pathology, 15, 149-159.

Figura 2. Microfotografia elettronica di rotavirus
Figure 2. Microphotograph of rotavirus particles

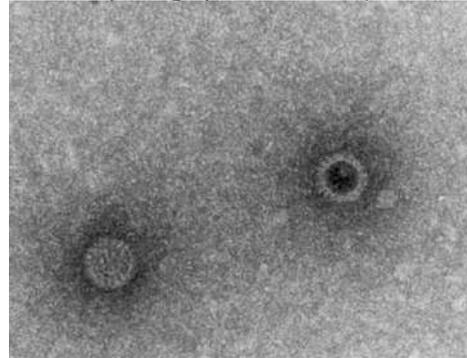
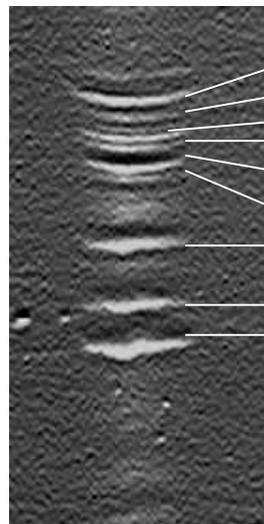


Figura 3. Elettroferotipo di rotavirus da starna (campione 508/02)

Figure 3. Electropherotype of rotavirus from grey partridge (sample 508/02)



COMUNICAZIONE 24

CASI DI CHERATOCONGIUNTIVITE DA *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* IN POLLASTRE COMMERCIALI

M. Rondena, T. Rampin, G. Manarolla, C. Longoni, G. Sironi, A. Montrasi, L.R. Sperati

Dip. di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sez. di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: pollo, *Mycoplasma gallisepticum*, cheratocongiuntivite uveite.

Mycoplasma gallisepticum keratoconjunctivitis in layer pullets – Case report

Key words: chicken, *Mycoplasma gallisepticum*, keratoconjunctivitis, uveitis

Summary: Two cases of keratoconjunctivitis in layer pullets are reported. Affected flocks had the same origin and were MG seronegative at hatching. In both cases, clinical signs appeared in 8 weeks old pullets of one house and then spread affecting the whole flock. MG seroconversion followed the onset of the disease. Morbidity was about 50%; at moving mortality and condemnation reached 5% and some blind pullets were detected. Histologically, ocular lesions consisted in serous to catarrhal keratoconjunctivitis and uveitis. Bursal and respiratory, but not ocular, cryptosporidiosis was observed in the pullets of one house only.

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

Introduzione

Mycoplasma gallisepticum (MG), notoriamente implicato in forme respiratorie nel pollo e in altre specie domestiche, causa di scarti al macello e di problemi di deposizione, è segnalato recentemente come causa di lesioni oculari sia in specie domestiche (1), sia in selvatici (2,3). Tali forme sono state descritte anche in Italia in varie tipologie di allevamento (4). Vista la peculiarità di tali forme e i problemi che pongono dal punto di vista epidemiologico e patogenetico, abbiamo ritenuto interessante descrivere 2 casi recentemente osservati in grossi allevamenti di pollastre commerciali.

Materiali e metodi

Casistica: Sono stati colpiti 2 allevamenti di pollastre commerciali allevate a terra, indicati come A e B. Le pollastre provenivano tutte dallo stesso incubatoio, con una differenza di età di 10 giorni tra i 2 allevamenti. In entrambi i gruppi, controlli sierologici al primo giorno di vita indicavano negatività per MG e MS. Tra i due allevamenti non vi era nessuno scambio di personale, attrezzature, veicoli ecc.

Allevamento A, costituito da 4 capannoni per un totale di 85.000 animali. La forma morbosa è comparsa in uno dei 4 capannoni in pollastre di 8 settimane. Dopo 4 settimane è passata al capannone attiguo, per poi interessare anche gli ultimi due. La comparsa della sintomatologia si accompagnava alla sieroconversione per MG. Dopo un trattamento senza successo nell'acqua con enrofloxacin, l'inoculazione di diidrostreptomina e tilosina ha risolto i casi clinici.

Allevamento B, costituito da 6 capannoni, per un totale di 150.000 animali. Le lesioni congiuntivali hanno fatto la loro comparsa in due capannoni non attigui alla medesima età dell'allevamento A. Anche qui il trattamento con Enrofloxacin si rivelava inefficace. A questo punto solo i 2 capannoni colpiti risultavano positivi sierologicamente per MG. Dopo 6 settimane, in seguito alla vaccinazione contro la Laringotracheite Infettiva, eseguita prudenzialmente per via idrica visti i precedenti problemi di lesioni oculari, la forma morbosa si è diffusa ai restanti capannoni, che hanno infatti mostrato sieroconversione per MG.

Dalle pollastre sintomatiche dei due allevamenti sono stati effettuati tamponi da congiuntiva e da cavità

nasali per la diagnosi di MG con PCR e isolamento, eseguita presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, sezione di Forlì, e presso un laboratorio privato. In entrambi gli allevamenti la morbilità si attestava attorno al 50%, mentre tra mortalità e scarti eliminati al carico si raggiungeva il 5%. Accanto alla forma oculare talora si notavano lievi sintomi respiratori con starnuti e scolo nasale. A parte ciò, fino al carico non si segnalavano altri problemi sanitari nelle pollastre di entrambi gli allevamenti. 56.000 pollastre dell'allevamento B venivano accasate in un centro di produzione dove, nella settimana successiva, morivano 1000 animali in pessimo stato di nutrizione. L'avvio della deposizione ha subito comunque un certo ritardo. Sono stati esaminati: 7 soggetti di 55 giorni e 10 di 62 giorni del primo capannone colpito dell'allevamento A; 5 soggetti di 60 giorni (primo capannone colpito); 6 soggetti di 102 giorni e 3 soggetti di 110 giorni (provenienti dall'ultimo capannone colpito e prelevati al momento del carico) dell'allevamento B. Tutti i soggetti esaminati venivano recapitati vivi. Dopo esame clinico e prelievo di sangue, venivano sottoposti a necropsia, nel corso della quale si prelevavano entrambi gli occhi e campioni di cavità nasali, trachea, polmoni, sacchi aerei, timo e milza per l'esame istologico. Gli occhi venivano fissati in soluzione di Davidson, gli altri campioni in formalina tamponata al 10%, per essere poi tutti processati secondo le normali procedure istologiche. L'esame sierologico sui campioni di sangue prelevati alla necropsia o da altri soggetti dei restanti capannoni venivano eseguiti a cura del veterinario responsabile degli allevamenti utilizzando il test di agglutinazione rapida con antigene del commercio.

Risultati

Le pollastre mostravano edema congiuntivale e congiuntivite da sierosa a catarral purulenta. La gravità delle lesioni variava anche tra i due occhi dello stesso soggetto. Talvolta si notava opacamento corneale (multifocale o diffuso). Non costantemente poteva essere presente flogosi delle cavità nasali. Non sempre facilmente valutabile era il grado di ipovisione delle pollastre, ma almeno 2 dei soggetti di 110 giorni dell'allevamento B erano sicuramente incapaci di

vedere ostacoli e muoversi in ambiente sconosciuto. All'esame necroscopico veniva rilevata, oltre ai modesti aspetti di flogosi delle cavità nasali, solo una lieve aerosacculite in 2 animali. Più comune era invece il riscontro di atrofia degli organi linfatici, soprattutto della borsa. Le pollastre oltre i 100 giorni si presentavano infine in stato di nutrizione scadente. L'esame istologico degli occhi rivelava aspetti comuni in tutti i campioni esaminati. Costantemente presente era una congiuntivite da subacuta a cronica, con iperplasia epiteliale e infiltrazione linfoplasmacellulare estendentesi fino alla sottomucosa, dove era inoltre visibile una notevole iperplasia delle strutture follicolari linfoidi. In alcuni campioni notevole era la congestione vasale accompagnata da marginazione eterofila. A carico della cornea si rilevava iperplasia e cheratinizzazione dello strato epiteliale superficiale, con evidente vacuolizzazione citoplasmatica delle cellule epiteliali basali oppure disaggregazione epiteliale fino a diffusa disepitelizzazione, soprattutto nelle aree centrali. Nello stroma corneale, accanto a necrosi delle fibre ed intensa neovascolarizzazione, la presenza di infiltrati infiammatori eterofili e linfoplasmacellulari caratterizzava il quadro di cheratite profonda. Anche in ambito endoculare si notavano vacuolizzazione e sofferenza dell'endotelio corneale. Alla cheratocongiuntivite, evidente già a livello clinico, si associavano quadri di uveite anteriore, coinvolgente l'angolo di filtrazione sclero-corneale, l'iride, i processi ciliari ed il corpo ciliare con infiltrati linfoplasmacellulari diffusi o in forma di aggregati simifollicolari. Nulla da segnalare invece alle strutture oculari posteriori. L'esame istologico dei campioni di apparato respiratorio rivelava occasionalmente lievi quadri di flogosi catarrale a livello di cavità nasali e di trachea. In 2 pollastre di 60 giorni dell'allevamento B veniva riscontrata la presenza di criptosporidi sulla mucosa tracheale e, in numero molto elevato, nella borsa di Fabrizio. In tutti i gruppi di pollastre esaminate gli organi linfatici mostravano aspetti di deplezione linfocitaria soprattutto a carico della Borsa di Fabrizio.

Discussione

Il riscontro di MG all'isolamento e alla PCR da soggetti sintomatici e la sierconversione che accompagnava la diffusione della forma morbosa in allevamento indicano in MG la causa o una delle cause (se altre ve ne sono) degli episodi di cheratocongiuntivite descritti. Sottolineiamo come entrambi gli episodi osservati per morbilità, mortalità e scarti, diffusione della malattia, inefficacia di trattamenti nell'acqua da bere, assenza di ulteriori problemi sanitari, abbiano avuto un andamento sovrapponibile, pur costituendo i due centri di produzione due unità epidemiologiche distinte. Il riscontro istologico di criptosporidi in un unico capannone dell'allevamento B può essere considerato accidentale e probabilmente in relazione con lo stato di deficit immunitario dimostrato dall'atrofia degli organi linfatici. Circa la causa di quest'ultima, dall'anamnesi non emergono sospetti di forme cliniche riferibili alle principali infezioni correlate a immunosoppressione. Per quanto riguarda la natura delle lesioni oculari, queste risultano sovrapponibili a quelle descritte come cheratocongiuntivite da MG (1,4). Anche in questi episodi la flogosi si estende al comparto anteriore dell'occhio e l'uveite, come la cheratocongiuntivite, è caratterizzata da abbondanti

infiltrati linfoplasmacellulari e da eterofili in più modesto numero. In sede endoculare la presenza di MG non è stata dimostrata (1), ma l'estensione della flogosi può comunque trovare spiegazione nelle chemochine prodotte da macrofagi in presenza di infezione da MG, che attraggono linfociti ed eterofili; questi ultimi a loro volta producono altre sostanze chemotattiche con conseguente accumulazione di cellule mononucleari (5). Da non trascurare è la possibilità che l'uveite cronicizzi e perduri anche dopo la remissione delle lesioni di congiuntiva e cornea, le uniche clinicamente evidenti. A questo proposito riteniamo che la mortalità registrata subito dopo l'accasamento nelle pollastre provenienti dall'allevamento B riguardasse verosimilmente soggetti ciechi o con visus molto compromesso come le ultime pollastre da noi esaminate. Nel nuovo ambiente questi soggetti non sarebbero riusciti ad alimentarsi e ad abbeverarsi, tanto da morire in stato di cachessia. Da ultimo, e non perché sia meno importante, vorremmo considerare l'aspetto epidemiologico. Naturalmente l'origine dell'infezione da MG potrebbe essere congenita, data la provenienza da un unico incubatoio e la vicinanza delle date di schiusa delle 2 partite colpite, anche se all'arrivo i soggetti testati risultavano sieronegativi. Ma le forme di infezione oculare da MG della primavera del 2001 (4) presentano casi distribuiti in partite così diverse per tipologia, origine e localizzazione geografica da non essere riconducibili ad un episodio di trasmissione verticale. Si è portati piuttosto a pensare alla diffusione di ceppi di MG con una nuova particolare fisionomia di patogenicità. Un analogo comportamento da parte di MG lo troviamo anche nella grave epidemia che ha colpito passeriformi nordamericani a partire dal 1994 (2,3) e che si è diffusa rapidamente, e con pesanti perdite, alle popolazioni selvatiche di molti stati (6). Le manifestazioni cliniche, infatti, consistevano in congiuntivite che si trasmetteva facilmente per contatto. Questi ceppi di MG sono considerati derivanti dall'allevamento avicolo (2), ma si distinguono in base ad analisi del DNA dai ceppi classici del pollo (7), non perdono comunque la capacità di infettare polli e tacchini, anche se sperimentalmente danno prova di scarsa patogenicità (8). Sarebbe interessante ampliare la conoscenza anche dei ceppi di MG implicati negli episodi riguardanti i nostri allevamenti da reddito e raccogliere dati circa l'attuale diffusione di queste forme.

Bibliografia

1. Nunoya S.H., Yagihashi T., Tajima M., Nagasawa Y. (1995) Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. *Vet. Pathol.* 32:11-18
2. Luttrell M.P., Fischer J.R., Stallknecht D.E., Kleven S.H. (1996) Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Dis.* 40:335-341
3. Ley D.H., Berkhoff J.E., McLaren J.M. (1996) *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Dis.* 40:480-483
4. Tosi G., Massi P. (2001) Infezione oculare da *Mycoplasma gallisepticum* in varie tipologie di allevamento. *Large Animals Review* 7(6): 95-96
5. Lam K.M., DaMassa A.J. (2003) Chemotactic response of Lymphocytes in chicken embryos infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Comp. Path.* 128:33-39
6. Roberts S.R., Nolan P.M., Lauerman L.H., Li L.Q., Hill G.E. (2001) Characterization of the mycoplasmal conjunctivitis epizootic in a house finch population in the southeastern USA. *J. Wildl. Dis.* 37:82-88
7. Hartrup B.K., Kollias G.V., Ley D.H. (2000) Mycoplasmal conjunctivitis in songbirds from New York. *J. Wildl. Dis.* 36:257-264
8. O'Connor R.J., Turner K.S., Sander J.E., Kleven S.H., Brown T.P., Gomez L., Cline J.L. (1999) Pathogenic effects on domestic poultry of a *Mycoplasma gallisepticum* strain isolated from a wild house finch. *Avian Dis.* 43:640-64

COMUNICAZIONE 25

IMPIEGO DI OLII ESSENZIALI ED ESTRATTI DI PIANTE NEL CONTROLLO DELL'ISTOMONIASI DEL TACCHINO: PROVE DI CAMPO ED INDAGINI DI LABORATORIO

G. Tosi¹, L. Ranieri², P. Pini², F. Ostanello³

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

²Chemifarma S.p.A – Forlì ³Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Università di Bologna

Parole chiave: *Histomonas meleagridis*, istomoniasi, tacchini, olii essenziali, estratti di piante

Use of ethereal oils and plant extracts on control of histomoniasis in turkey: field trials and laboratory investigations.

Key words: *Histomonas meleagridis*, histomoniasis, turkey, ethereal oils, plant extracts.

Summary: some field trials about the control of histomoniasis in turkeys are described. The control method used included: a) the control of infestation by *Heterakis gallinarum*, b) the laboratory monitoring of disease onset (number of parasites), c) the employ in the feed of a natural product made from vegetable extracts. During the trials the main zootechnical parameters were checked and some anatomo-pathological and parasitological tests were carried out. The results obtained are analysed in the following discussion.

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

Introduzione

L'istomoniasi (nota anche con il termine di "tiffloepatite") è una malattia contagiosa sostenuta da un protozoo flagellato, *Histomonas meleagridis*. L'infezione si contrae attraverso un nematode (*Heterakis gallinarum*) che funge da ospite intermedio del protozoo. Recentemente è stata dimostrata anche la trasmissione diretta da un animale all'altro per via cloacale (4). La malattia colpisce soprattutto il tacchino, ma viene segnalata anche nel pollo e in altri volatili sia domestici che selvatici. L'incidenza di questa patologia è in aumento per due motivi: a) La diffusione di allevamenti "free range". b) La totale mancanza di presidi farmacologici efficaci sia nella prevenzione che nella cura dell'istomoniasi (1). Con la messa al bando dei nitroimidazolici e, a partire dal 31/03/2003 (Reg. 1756/2002 del 23/09/2002), del nifursol, i veterinari del settore avicolo si trovano privi di strumenti in grado di contrastare efficacemente la malattia. In tale situazione si è cercato di attuare un controllo della problematica in campo ponendo particolare attenzione ai seguenti aspetti: a) biosicurezza mirata, in particolare, al controllo dell'*Heterakis gallinarum* mediante trattamenti sistematici alla partenza del ciclo; b) monitoraggio, in momenti precisi del ciclo produttivo, della presenza dei protozoi; c) impiego nel mangime di un prodotto naturale a base di estratti vegetali ottenuti per distillazione da più specie di piante officinali, purificati e concentrati (Fitotril®). L'attività del prodotto Fitotril®, dovuta alla sua particolare composizione, è stata precedentemente verificata con test sperimentali *in vitro* sulla sensibilità dei singoli patogeni (5). Le prove in campo sono state effettuate in due diversi momenti. Nel 2002 si è confrontata l'efficacia di campo in quattro diversi capannoni di un unico allevamento di un mangime additivato con nifursol rispetto ad un mangime contenente Fitotril® nel controllo dell'insorgenza di istomoniasi, nelle rese al macello e nell'indice di conversione dell'alimento (ICA) (Caso n. 1). Successivamente, nel 2003, si è verificata l'efficacia di campo nel controllo dell'insorgenza dell'istomoniasi, nelle rese al macello e nell'ICA di un mangime contenente Fitotril® in due gruppi integrati, coinvolgendo un totale di circa 100.000 capi su 5 diversi allevamenti (Caso n. 2). In tutte le prove si è

cercato di rivolgersi ad allevamenti con condizioni e tecnologie di allevamento considerate a maggior rischio di malattia.

Materiali e Metodi

Prove di campo: le prove sono state eseguite inserendo il prodotto nelle normali fasi alimentari dei tacchini fino all'età di 100 giorni alla dose di 1,0 kg/tonnellata. I mangimi, formulati in base ai fabbisogni nutrizionali indicati dai fornitori della linea genetica, contenevano coccidiostatico per tutta la durata dello studio. Il protocollo sperimentale prevedeva un monitoraggio nei confronti della presenza di protozoi in date prestabilite.

Parametri zootecnici considerati: in ciascuno dei gruppi sottoposti alla prova sono stati raccolti i dati relativi a Indice di mortalità (IM), indice di conversione dell'alimento (ICA), peso totale alla macellazione (TW), peso medio di macellazione (AW), età media di macellazione (AS).

Indagini di laboratorio: all'età di 20, 40 e 60 giorni un numero significativo di soggetti vivi (0,5‰ del gruppo) è stato conferito al laboratorio. Sugli animali (sottoposti ad eutanasia) sono stati eseguiti i seguenti accertamenti: esame anatomo-patologico (con particolare riguardo all'eventuale presenza di lesioni macroscopiche epatiche ed enteriche); esame parassitologico a fresco di tutti gli intestini con indicazione di tutte le forme protozoarie ed elmintiche eventualmente presenti. La rilevazione delle forme protozoarie flagellate è stata ottenuta anche attraverso il seguente esame colturale: 1 ml di contenuto cecale è stato inoculato in un substrato liquido costituito da terreno per colture cellulari (199 medium senza bicarbonato), estratto di embrione di pollo e siero ovino. I campioni sono stati incubati a 40°C e osservati quotidianamente (fino a 96 ore dalla semina) al microscopio a contrasto di fase (2, 3). Il livello di infestazione è stato espresso con un punteggio variabile da + a ++++.

Risultati

Prove di campo: Caso n.1 (08/02 – 12/02)

Gruppo di prova (Fitotril®), (Tabella 1).

Capannoni 1 e 4: alimentazione standard + Fitotril® 0,1% di inclusione nel mangime.

Gruppo di controllo (nifursol)

Capannoni 2 e 3: alimentazione standard + Nifurene (nifursol 10%) 0,05% di inclusione nel mangime. I capannoni sono tutti senza pavimentazione cementata.

Tabella 1. Parametri zootecnici – caso n. 1.

Table 1. Zootechnical parameters – case n. 1.

Cap.	S.	N°	TW	AW	AS	ICA
1-4	F	4.083	33.075	8,00	96	2,38
1-4	M	5.586	104.436	18,70	141,4	2,38
2-3	F	4.025	34.255	8,51	98,3	2,34
2-3	M	5.746	103.964	18,09	132,8	2,34

Indagini di laboratorio: Caso n. 1.

Tabella 2. Risultati delle indagini di laboratorio – caso n. 1.

Table 2. Laboratory results – case n. 1.

Capannone	Lesioni	Esame parassitologico
Controllo	Colisetticemia	Negativo
2 – 3	Congestione pancreatica, intensa iperemia intestinale	Positivo Protozoi flagellati +++
1 – 4	Congestione pancreatica, intensa iperemia intestinale	Positivo. Protozoi flagellati ++ Coccidiosi: ++
1 – 4	Lesioni da stafilococco	Negativo
2 – 3	Colisetticemia	Negativo

Prove di campo: Caso n. 2. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 3.

Discussione

Caso n. 1.

Prove di campo: i risultati ottenuti evidenziano come ambedue i gruppi trattati abbiano fornito parametri zootecnici analoghi e considerati in linea con standard produttivi elevati. Questi risultati sono di assoluto rilievo considerando che è stata messa a confronto una sostanza con attività farmacologica ed un prodotto di origine vegetale (Tabella 1). Indagini di laboratorio: dall'esame dei soggetti conferiti al laboratorio non sono emerse differenze significative fra i due gruppi. La presenza del parassita è stata riscontrata all'età di circa 40 giorni in entrambi i gruppi. Tale infestazione ha provocato la comparsa, in allevamento, di problemi enterici (lettieria bagnata) senza causare lesioni riferibili a tifo-epatite (Tabella 2).

Caso n. 2.

Prove di campo: i risultati ottenuti hanno evidenziato un peggioramento dei parametri zootecnici in tutti gli allevamenti (tranne il N° 4). Questi risultati potrebbero essere messi in relazione al particolare andamento

climatico ed alle condizioni tecnico-ambientali degli allevamenti monitorati. Va inoltre considerato che negli altri allevamenti appartenenti ai gruppi integrati coinvolti nello studio si sono ottenute performances similari. Un altro dato interessante riguarda la comparsa della malattia nell'allevamento scelto come controllo ed in due allevamenti alimentati con mangime interamente vegetale e privo di coccidiostatico e Fitotril® (Tabella 3). Indagini di laboratorio: in tutti gli allevamento sottoposti a trattamento non è stata evidenziata la presenza del parassita durante i primi 60 giorni di vita. Nel gruppo non trattato è stata invece rilevata infestazione (con indice di gravità ++) all'età di 60 giorni. Tale infestazione ha provocato la comparsa di problemi enterici senza causare lesioni riferibili a tifo-epatite. In totale sono stati esaminati circa 90 capi.

Conclusioni

Alla luce della mancanza di idonei presidi farmacologici per il controllo e la prevenzione dell'istomoniasi, l'approccio multifattoriale adottato nel corso dello studio ha fornito risultati positivi. L'utilizzo di un prodotto di origine vegetale nel mangime risulta di valido aiuto nella profilassi della malattia; inoltre la flessibilità del prodotto permette di modularne le dosi di inserimento in funzione delle particolari condizioni ambientali e climatiche. La proporzione di capannoni in cui è stata evidenziata la presenza del parassita è statisticamente più elevata negli allevamenti in cui non è stato somministrato il prodotto rispetto ai controlli (chi-quadrato= 5,34; $p = 0,023$). Nel corso dello studio si è affrontata anche la possibilità di intervento, in casi di particolare gravità, nell'acqua di bevanda, per un periodo limitato, con Fitotril® liquido; tale opportunità verrà studiata nel corso di un'ulteriore prova.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa collaborazione veterinari e tecnici dei gruppi avicoli Amadori e Martini S.p.A.

Bibliografia

- Callait M.P., Granier C., Chauve C., Zenner L. (2002): "In vitro activity of therapeutic drugs against *Histomonas meleagridis*". Poultry Science 81:1122-1127.
- Dwyer D.M. (1970). "An improved method for cultivating *Histomonas meleagridis*". Journal of Parasitology 56:191-192.
- McDougald L.R. (1973). "In vitro isolation of *Histomonas meleagridis* as a potential useful diagnostic aid". Avian Diseases 17:847-850.
- McDougald L.R. (1997). "Other protozoan diseases of the intestinal tract". In Diseases of Poultry 10th ed. B.W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 890-895.
- Zenner L. (2003). Comunicazione personale.

Tabella 3. Parametri zootecnici – caso n. 2.

Table 3. Table 1. Zootechnical parameters – case n. 2.

All	Accasamento	densità	sesso	N°	TW	AW	AS	Mortalità	I.C.A.
1	17/02/03	5,20	M	60.860	814.092	15,7	141	14,8	2,85
2	01/04/03	3,91	M	12.385	107.814	15,03	140	7,65	2,49
2	01/04/03	3,91	F	8.375	62.060	7,41	95	7,65	2,49
3	28/03/03	3,20	M	4.158	1.100	14,08	133	18,9	2,65
4	18/03/03	5,20	M	10.083	188.919	18,8	133	6,7	2,36
4	18/03/03	5,20	F	9.226	75.783	8,21	82	6,7	2,36
5	18/03/03	5,20	M	22.600	332.931	16,83	131	12,47	2,43

COMUNICAZIONE 26

EFFETTO DELL'AZIONE COMBINATA DI ACIDI ORGANICI ED OLII ESSENZIALI INCAPSULATI SULLE PERFORMANCE ZOOTECNICHE DI TACCHINI FEMMINE – PROVA DI CAMPO

S. Bertuzzi¹, N. Tallarico¹, C. Canali²

¹SODA Feed Ingredients Srl, ITALIA; ²Allevatore

Parole chiave: acidi organici, oli essenziali, incapsulati, tacchini

Effect of combined action of microencapsulated organic acids and essential oils on performance of female turkey – field test

Key words: organic acids, essential oils, coated, turkey

Summary: A field trial was conducted in a Northern Italy farmer to investigate the combined action of dietary supplementation of organic acids (FORMYL SC[®]) and essential oils (AVIGRO[®]) on performance of female turkey compared with a vegetable extract (CITRUS). All productive traits were positively affected by dietary treatment with acid and acid plus essential oil microencapsulated products.

Correspondence: Stefano Bertuzzi - SODA Feed Ingredients srl – via Giacomo Leopardi 2/c 42025 Cavriago (RE) ITALIA –. Email bertuzzi@soda-ingredients.com

Introduzione

Dopo la messa al bando nel 1999 dei principali fattori di crescita, ed in attesa dell'applicazione della nuova direttiva dell'EU che prevede l'abolizione a partire dal 1 Gennaio 2006 dei restanti, si sono moltiplicate le ricerche aventi lo scopo di individuare prodotti alternativi da impiegarsi nell'alimentazione degli animali da reddito. Negli ultimi tempi, i principali sforzi si sono indirizzati prevalentemente verso gli acidi organici ed inorganici (4, 5), e gli oli essenziali (2, 6).

L'inclusione di acidi nelle diverse forme (liquidi, adsorbiti, microincapsulati, etc) è una delle tecniche impiegate in nutrizione animale col fine di sfruttare la loro azione antiagonista nei confronti di molti microrganismi intestinali. Fino a pochi anni fa, le nozioni sul meccanismo di azione degli acidi si basavano esclusivamente sulla loro proprietà acidificante. L'abbassamento del pH crea infatti un ambiente ostile alla proliferazione dei batteri, determinando effetti positivi sulle performance (13), effetti sanitari (7) e risposte antibatteriche (3). Oggi è invece noto che l'azione degli acidi è anche dovuta all'effetto anione degli acidi indissociati (9). Questi riescono, infatti, a penetrare nella cellula attraverso la frazione lipidica della membrana cellulare. Una volta entrati si dissociano liberando ioni H⁺ che essendo tossici per la cellula devono essere allontanati. Questo lavoro provoca un dispendio di energia compromettendo la moltiplicazione cellulare.

Gli oli essenziali agiscono invece riducendo la permeabilità e l'integrità della membrana citoplasmatica con conseguente diminuzione dell'ATP intracellulare, modificando il potenziale di membrana ($\Delta\psi$), e determinando una riduzione del pH intracellulare (10, 15). L'uso di oli essenziali presenta lo svantaggio di essere irritanti per le mucose di animali ed operatori.

Anche l'impiego dei cosiddetti acidi liberi provoca problemi per strutture ed addetti. Inoltre anche dopo l'inclusione nella dieta di notevoli quantità (1-2%), questi sono rapidamente neutralizzati nel tratto iniziale dell'intestino tenue, per l'azione tamponante effettuata dal pancreas. 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.(14).

Alla luce del sempre maggiore utilizzo sia degli acidi che degli oli essenziali, il settore R&D di SODA Feed Ingredients ha studiato una tecnica di incapsulazione che permette al principio attivo di essere "intrappolato" e protetto da una matrice "attiva" grassa. Questa consente al prodotto di essere attivo prevalentemente nel sito d'azione specifico essendo studiata per favorire un rilascio mirato e/o continuato. Inoltre evita l'azione degradante nei confronti degli altri ingredienti acido-sensibili come esempio la vitamina A, blocca la volatilità di alcuni acidi come il formico, e riduce gli inconvenienti degli acidi ed oli essenziali. Questo microgranulo 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 incapsulati nel pollo da carne (OVIGRAM[®]), nel tacchino da carne (FORMYL[®]) e nella gallina ovaioia (FORMYL SC[®]), ha mostrato nel primo caso una riduzione della colonizzazione della *Salmonella kedougou* (11) e una attività simile alla flavomicina (8), nel tacchino una riduzione dei batteri patogeni (12) e nell'ovaioia un calo della mortalità e delle lesioni dovuti a colisetticemia (1)

Lo scopo di questa prova di campo è di verificare l'azione combinata nell'uso di una miscela di acido citrico e acido formico (FORMYL SC[®]) nelle prime fasi dell'allevamento, e di una miscela di acidi ed oli essenziali (AVIGRO[®]) fino alla macellazione, sulle performance produttive di tacchini femmine rispetto all'integrazione con estratti vegetali (Citrus). Il programma è stato studiato in modo di sfruttare l'azione più energica del FORMYL SC[®] nelle prime fasi del ciclo quando maggiori possono essere i problemi da contaminazioni batteriche, sostituendolo successivamente con AVIGRO[®] capace di mantenere il buono stato sanitario degli animali.

Materiali e metodi

La prova è stata condotta presso un allevamento di tacchini del Nord Italia. Nello stesso capannone sono state accasate 10.000 tacchine femmine Nicholas, equamente suddivise in due gruppi, Trattato e Controllo. Il gruppo di Controllo ha ricevuto una dieta commerciale integrata con 200 g/ton di un prodotto a base di estratti vegetali (Citrus), mentre il gruppo Trattato ha ricevuto la stessa dieta commerciale

integrata con FORMYL SC® nella dose di 5 e 3 kg/ton rispettivamente nelle prime 3 settimane e dalla 4° alla 6° settimana di vita, e con 0,5 kg/ton di AVIGRO® dalla 7° settimana fino alla macellazione.

Durante le fasi di allevamento sono stati registrati la mortalità giornaliera ed il consumo di mangime, ed alla macellazione, il peso degli animali e l'indice di conversione alimentare.

Risultati

L'impiego combinato nel tempo dei due prodotti microincapsulati ha determinato un calo della mortalità pari a 0,9 punti percentuali (Figura 1). Nei primi 40 giorni di vita il gruppo di Controllo è stato trattato con tetracicline in acqua da bere per problemi enterici.

Il peso medio alla macellazione dei tacchini del gruppo Trattato è stato di 150 g più alto, mentre il consumo medio di mangime è stato di 1,74 g più basso rispetto al Controllo (grafici 2, 3).

L'ICA è risultato essere circa il 3% più basso nel gruppo Trattato rispetto al Controllo (Figura 4).

Discussione

La somministrazione combinata nel tempo di acidi organici ed oli essenziali è risultata essere una buona strategia manageriale applicabile negli allevamenti di tacchini. Questo è probabilmente imputabile all'azione modulatrice nei confronti della flora batterica di FORMYL SC® nelle prime fasi del ciclo, e di "mantenimento" di un buono stato sanitario di AVIGRO® nelle fasi successive. Infatti, tutti i parametri zootecnici presi in considerazione sono risultati migliori nel gruppo Trattato rispetto al Controllo. E' altresì importante considerare che il gruppo Trattato non ha necessitato di nessun trattamento aggiuntivo a differenza del Controllo che è stato trattato con tetracicline nei primi 40 giorni di vita. Inoltre dall'analisi dei costi, il trattamento con FORMYL SC® ed AVIGRO® è risultato economicamente conveniente rispetto al Controllo.

Bibliografia

- Bertuzzi S., Matteucci D. (2002) – Atti XLI Convegno SIPA, Forlì 2002, Large Animal Review, 6, 123-4
- Botsoglou N.A. et al. (2002) – Br. Poult. Sci. 43 (2), 223-230.
- Cherrington C.A. et al. (1991) Advances in microbial physiology, 42, 87-108.
- Cox N.A., McHan, F. and Bailey, J. S. (1994) - J. Appl. Poultry Res. 3: 315-318.
- 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.
- Giannenas I. et al. (2003) – Arch Tierernähr., 57 (2), pp99-106
- Hall et al., (1990) Veterinary record, 126:12, 297.
- Huyghebaert G. (2002) Proc 11th European Poultry Conference, 6-10 september, Bremen Germany. Arch. Geflügelk, 66, 108.
- Kirsi P. (2001) – in Piva A., Bach Knudsen K.E., Lindberg J.E. Gut Environment of Pigs, Nottingham University Press, 201-215.
- Lambert R.J.W. (2001) - J. Appl. Microbiol. 91, 453-462
- Manfreda G., De Cesare A. (2000) Proc. XXI World's Poultry Congress, Montreal, Canada, August 20-24.
- Manfreda G., Bertuzzi S., De Cesare A. and Cerchiari E. (2001) Proc. 13th Eur. Symp. Poult. Nutr., oct. 2001 Blankenberge, Belgium, pp 296-7.
- Patten J.D., Waldroup P.W. (1988) Poult. Sci., 67, 1178-82.

14. Small P. et al. (1994) Journal of Bacteriology, p.1729-1737.

15. Ultee A., Kets E.P.W., Smid J (1999) – Appl. Env. Microbiol. 65 (10), 4606-4610.

Figura 1: Mortalità totale (%).

Figure 1: Total mortality (%)

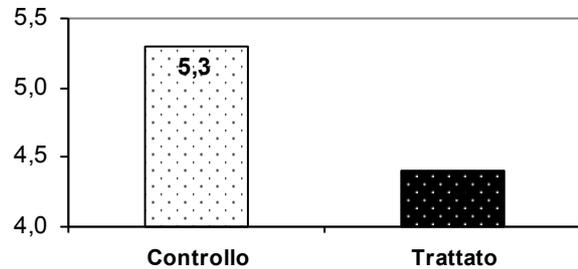


Figura 2: Peso alla macellazione (g).

Figure 2: Weight at the finish (g)

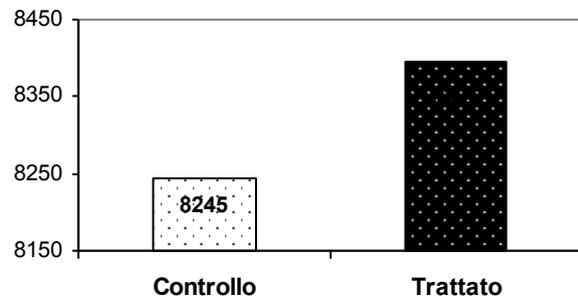


Figura 3: Consumo di mangime (g/capo/giorno).

Figure 3: Feed intake (g/head/day)

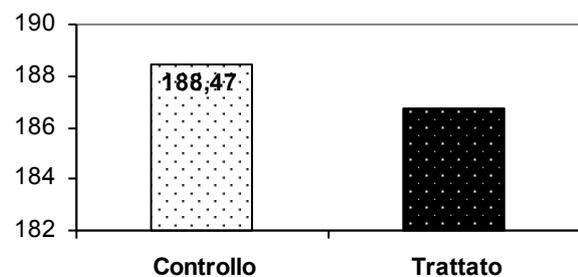
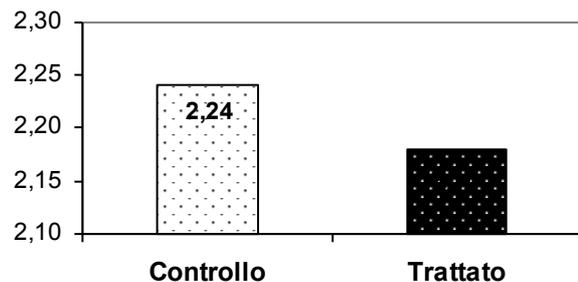


Figura 4: Indice di conversione alimentare.

Figure 4: Feed conversion rate



COMUNICAZIONE 27

EFFICACIA DI UNA MISCELA DI OLI ESSENZIALI INCAPSULATI NEI CONFRONTI DI UNA COCCIDIOSI MISTA NEL POLLO DA CARNE. STUDIO PRELIMINARE

S. Bertuzzi¹, N. Tallarico¹, L. Fiorentini²

¹SODA Feed Ingredients Srl, ITALIA.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna - Sezione di Forlì

Parole chiave: oli essenziali, incapsulati, coccidiosi, pollo da carne

Efficacy of a blend of coated essential oil, against coccidiosis in broiler. Preliminary study

Key words: essential oil, coated, coccidiosis, broiler

Summary: A in vivo trial was conducted to investigate the effect of dietary supplementation of blend of micro-encapsulated essential oil (RepaXol®), at the dose of 200 g/ton for 16 days on challenge with *E. tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima* in broiler of 15 days of age. The blend of microencapsulated essential oils reduced completely the presence of coccidia in faeces of birds.

Correspondence: Stefano Bertuzzi - SODA Feed Ingredients Srl – Via G. Leopardi, 2/C, 42025 Cavriago (RE) ITALIA - Email bertuzzi@soda-ingredients.com

Introduzione

La coccidiosi è considerata la malattia parassitaria che ha il più elevato impatto economico nella produzione avicola. I costi mondiali ogni anno sono stimati nell'ordine di circa 800 milioni di dollari (8). Queste stime considerano i costi legati all'utilizzo dei farmaci come profilattici e come terapeutici, ma anche alle perdite dovute alla mortalità, morbidità e al minore indice di conversione degli animali che si infettano con questa malattia.

Il controllo della coccidiosi si attua attraverso una buona disinfezione dei capannoni prima dell'introduzione di nuovi soggetti, l'utilizzo nei mangimi di anticoccidici e la vaccinazione.

Negli ultimi anni sospinti dalle decisioni della Unione Europea di proibire dal 2006 l'utilizzo di antibiotici come promotori di performance (monensin sodium, salinomycin sodium, avilamycin e flavophospholipol), tra i quali anche prodotti utilizzati come anticoccidici, si stanno esaminando diversi tipi di sostanze come prodotti alternativi per il controllo della coccidiosi. Moltissimi prodotti o ingredienti naturali sono stati testati per verificarne la loro azione (1).

Tra questi sono stati utilizzati a) fonti di grasso contenenti alti percentuali di acidi grassi n-3 (acido docosaesaenoico, acido eicosapentenoico, acido linolenico) (2,3); b) Artemisina, derivante dalla Artemisia annua, sostanza con attività antimalarica (4); c) estratti vegetali, oli essenziali (9) e spezie, contenenti curcumina (1); d) betaina in associazione con salinomicina (5).

Gli oli essenziali agiscono riducendo la permeabilità e l'integrità della membrana citoplasmatica con conseguente diminuzione dell'ATP intracellulare, modificando il potenziale di membrana ($\Delta\psi$), e determinando una riduzione del pH intracellulare (6, 7).

Il settore R&D di SODA Feed Ingredients ha predisposto una miscela di oli essenziali (RepaXol®), da integrare nel mangime, che può aiutare a modulare le componenti biologiche presenti nell'intestino, quali flora microbica e parassiti. Tale preparato innovativo associa tecniche di coacervazione complessa con il processo di granulazione protettiva MICROPEARLS® (Figura 1). E' un preparato ad alta tecnologia che garantisce agli oli essenziali una eccezionale resistenza alle alte temperature (fino a 130°C per 60 minuti). La particolare tecnica protettiva consente

inoltre una resistenza in ambiente gastrico superiore all'80%. Due fattori di estrema importanza per questi ingredienti che sono facilmente degradabili.

Lo scopo di questa prova era di verificare nel pollo da carne l'efficacia di tale miscela di oli essenziali protetti alla dose di 200 g/ton, nei confronti di una infezione sperimentale con miscela mista di coccidi (*E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*). L'azione di questi oli essenziali protetti è stata confrontata con prodotti convenzionali (Ionoforo) e non (artemisina e betaina).

Figura 1: Immagine di RepaXol® al microscopio.

Figure 1: Microscopic picture of RepaXol®



Materiali e metodi

La prova è stata effettuata presso il Centro sperimentale "Il Poggio" a Castel S. Pietro Terme (BO).

Animali: sono stati utilizzati 100 pulcini, ceppo Cobb 500, suddivisi in 5 gruppi di 20 animali (4 repliche per 5 animali ciascuna), alimentati ad libitum con un mangime convenzionale integrato con diverse sostanze.

Gruppi in prova: i 5 gruppi presentavano le seguenti integrazioni dietetiche:

- gruppo A – monensin (100 ppm);
- gruppo B – Artemisina (10 ppm);
- gruppo C – Betaina (15 ppm);
- gruppo D – Repaxol® (200 g/ton di mangime);
- gruppo E – Controllo non integrato.

Infezione sperimentale: all'età di 18 giorni tutti gli animali sono stati infettati, utilizzando una sonda

esofagea, con una miscela di coccidi contenente per animale 5×10^4 di *E. acervulina*, 10^3 di *E. maxima*, 3×10^4 di *E. tenella* (oocisti sporulate).

Dopo 7 giorni, verificata la positività di tutti i gruppi in esame, si è iniziata la somministrazione della dieta integrata con le diverse sostanze.

Esami post trattamento: sette e sedici giorni dopo l'inizio del trattamento dietetico, sono state analizzate le feci di tutti i gruppi in esame al fine di verificare la presenza/assenza delle oocisti e la mortalità dei singoli gruppi.

La sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna ha predisposto la miscela di coccidi per l'infezione sperimentale ed ha effettuato la ricerca delle oocisti nelle feci degli animali in prova.

Risultati

L'azione positiva della miscela di oli essenziali si esplica già dopo 7 giorni di trattamento e si mantiene costante anche fino al termine della prova (16 giorni post trattamento) (Tabella 1).

Anche il gruppo integrato con lo ionoforo (monensin) risulta completamente negativo alla fine del trattamento, pur presentando presenza di oocisti dopo 7 giorni di integrazione (Tabella 1).

Gli altri due gruppi integrati con prodotti non convenzionali (betaina e artemisina) non riescono nel periodo in prova a negativizzarsi completamente per la presenza di oocisti nelle feci (Tabella 1).

Gli animali trattati con gli oli essenziali non hanno presentato mortalità. Nel gruppo integrato con monensin si è registrato un unico soggetto morto (1/20=5%). Tale andamento conferma i risultati degli esami parassitologici. (Figura 2).

Discussione

L'utilizzo della miscela protetta di oli essenziali denominata RepaXol[®], alla dose di 200 g/ton per 16 giorni, ha permesso di controllare l'infezione coccidica

mista di *E. acervulina*, *E. tenella* ed *E. maxima*.

Tabella 1. Presenza/assenza di oocisti nelle feci dei diversi gruppi in prova.

Table 1. Positive/negative samples of oocistis in different groups.

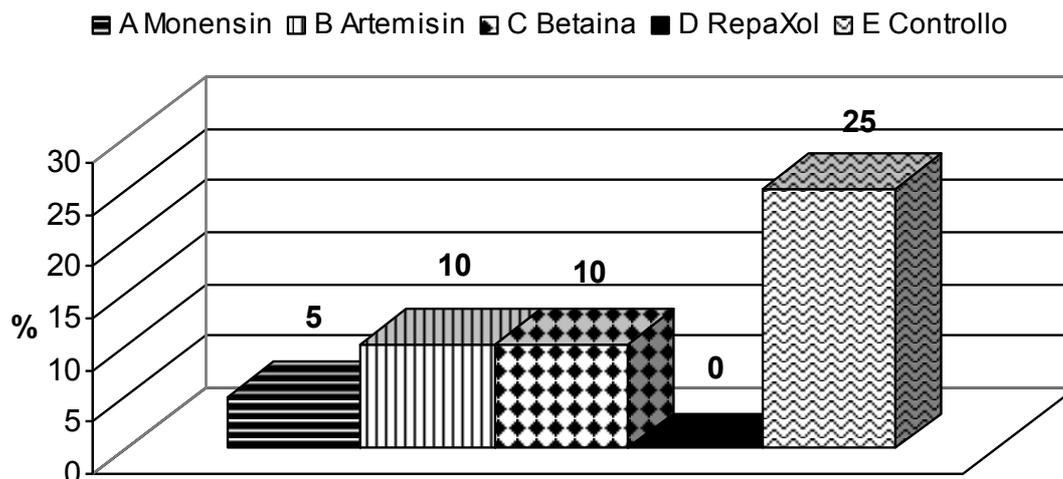
TESI Composizione	Inizio del trattamento	7 gg post trattamento	16 gg post trattamento
A Monensin (100 ppm)	+	+ -	-
B Artemisin (10 ppm)	+	+ -	+ -
C Betaina (15 ppm)	+	+ -	+ -
D Repaxol (200 g/ton)	+	-	-
E Controllo	+	+	+

Bibliografia

- Allen P.C., Danforh H.D. e Augustine P.C. (1998) – Int. J. Parasitol., 28, 1131-40.
- Allen P.C., Danforh H.D. e Levander O.A. (1996) – Pou. Science, 75, 179-185.
- Allen P.C., Danforh H.D. e Levander O.A. (1997a) – Pou. Science, 76, 822-27.
- Allen P.C., Lydon J. e Danforh H.D. (1997b) – Pou. Science, 76, 1156-73.
- Augustine P.C e Danforh H.D. (1999) – Avian Dis., 43, 89-97.
- Lambert R.J.W. (2001) - J. Appl. Microbiol. 91, 453-462
- Ultee A., Kets E.P.W., Smid J (1999) – Appl. Env. Microbiol. 65 (10), 4606-4610.
- William R.B. (1998) - Int. J. Parasitol., 28, 1089-98.
- Youn H.J., Noh J.W. (2001) – Vet. Parasitol., 96, 257-263.

Figura 2. Mortalità nei diversi gruppi nel periodo successivo all'infezione sperimentale

Figure 2. Mortality in different groups during post challenge period



COMUNICAZIONE 28

EVIDENZA DI PNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A IN CORSO DI UN FOCOLAIO DI TRT IN TACCHINI DA CARNE IN ITALIA

M. Cecchinato¹, E. Catelli¹, C.E. Savage², P. De Matteo¹, M. Faenzi³, C.J. Naylor²

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna - Ozzano Emilia (BO) - Italia; ²Department of Veterinary Pathology - University of Liverpool (UK); ³Gruppo Amadori - S. Vittore (FC) - Italia.

Parole chiave: Rinotracheite del tacchino, TRT, Pneumovirus aviare sottotipo A, Tacchino da carne, Nested RT-PCR

Detection of avian pneumovirus subtype A during an outbreak of TRT in meat turkeys in Italy

Key words: Turkey rhinotracheitis, TRT, Avian Pneumovirus subtype A, Meat turkey, Nested RT-PCR

Summary: An outbreak of Turkey rhinotracheitis caused by an Avian pneumovirus (APV) subtype A is described in one Italian meat turkey farm. The flocks were sited in Perugia province. Virus isolation was performed in chicken tracheal organ cultures and the strain was typed by a subtype specific nested RT-PCR. This is the first evidence that APV subtype A is present in Italy.

Correspondence: Mattia Cecchinato - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria – Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO). Email mcecchinato@vet.unibo.it

Introduzione

Il Pneumovirus Aviare (APV) è un virus ad RNA appartenente alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al nuovo genere *Metapneumovirus*. E' causa nel tacchino di una infezione delle prime vie respiratorie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT), mentre nel pollo è responsabile di una forma respiratoria lieve, a volte inapparente, che può sfociare nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di APV, distinti variamente fra loro sia dal punto di vista genetico che sierologico. I sottotipi A e B, diffusi in Europa sin dalla prima comparsa della malattia, differiscono sulla base della sequenza nucleotidica del gene G che codifica per la omonima glicoproteina di superficie (7). Il sottotipo C, che è stato segnalato più recentemente negli Stati Uniti d'America, ha invece differenze genomiche e sierologiche più evidenti rispetto ai precedenti (9); come anche il sottotipo D che comprende per ora unicamente 2 ceppi isolati in Francia nel 1985 (1). La tipizzazione molecolare eseguita sui primi isolati italiani provenienti da allevamenti di tacchini del Nord Italia, ha dimostrato la presenza nel nostro Paese del sottotipo B (7; Sperati Ruffoni L., comunicazione personale), e la diffusione dello stesso sottotipo in provincia di Verona è stata recentemente confermata sia nel pollo che nel tacchino (2; 3). I dati disponibili sono quindi sino ad ora relativi ad un'area geografica limitata e quindi insufficienti a definire un quadro completo dell'epidemiologia dell'infezione da APV in Italia. Allo scopo di ottenere ulteriori preziose informazioni sulla diffusione della malattia e l'eventuale presenza di altri sottotipi di APV abbiamo ampliato l'indagine virologica e molecolare a regioni del centro Italia.

Con la presente comunicazione riportiamo l'isolamento virale di un ceppo di APV sottotipo A, in corso di un focolaio di TRT in tacchini da carne in provincia di Perugia.

Materiali e Metodi

Allevamento

Il focolaio di TRT oggetto dello studio si è verificato in un allevamento di tacchini da carne localizzato in provincia di Perugia, appartenente ad una grossa azienda avicola italiana.

I gruppi di tacchini sono stati vaccinati nei riguardi della TRT per via oculo-nasale a 7 giorni di età con un vaccino vivo attenuato del sottotipo B. In allevamento

erano presenti 4 gruppi di tacchini maschi, di consistenza variabile dai 4000 ai 5000 soggetti per gruppo. Essi hanno mostrato i primi sintomi respiratori, caratterizzati da starnuti, scolo nasale ed oculare, e difficoltà respiratoria a circa 45 giorni di età. La forma respiratoria, che è stata in alcuni casi complicata da infezioni secondarie, ha gradualmente interessato tutti i gruppi causando una mortalità totale del 10-11%.

Campionamento

Il campionamento è stato eseguito in 2 capannoni (numero 3 e 4). Per ciascun gruppo sono stati scelti 10 tacchini con forma respiratoria iniziale per aumentare la probabilità dell'isolamento virale. Da ciascun animale sono stati raccolti contemporaneamente due tamponi rinofaringei, destinati rispettivamente alla nested RT-PCR ed all'isolamento virale. I tamponi destinati alla RT-PCR sono stati asciugati all'aria per 30 minuti e conservati a temperatura ambiente sino alla processazione. Quelli destinati allo isolamento virale sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di ghiaccio fondente sino al momento della preparazione dell'inoculo, che è stata eseguita all'arrivo in laboratorio. I tamponi sono stati processati in pool di 10 ed i campioni accettati come riportato in tabella 1:

Tabella 1: Campioni esaminati

Table 1: *exained samples*

Capannone	Isolamento virale	Nested RT-PCR
3	259-01/03	259-02/03
4	259-03/03	259-04/03

Nested RT-PCR

Per evidenziare e tipizzare APV dai tamponi a secco, e confermarne l'isolamento virale, è stata impiegata una nested RT-PCR, basata sulla sequenza del gene G ed in grado di differenziare i sottotipi A e B. L'estrazione dell'RNA dai tamponi a secco e la retrotrascrizione sono state eseguite secondo il metodo descritto da Cavanagh *et al.* (1999) (4). L'RNA virale dal terreno colturale è stato estratto utilizzando un kit del commercio (QIAamp viral Mini Kit, Qiagen). La nested PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Naylor *et al.* (1997) (8). La PCR interna utilizzava un primer antisense (G5-) comune ad ambedue i sottotipi, e 2 primer senso, uno per il sottotipo A (G8+A) in grado di generare un cDNA di

268bp e l'altro specifico per il sottotipo B (G9+B) in grado di generare un cDNA di 361bp. Il prodotto della amplificazione, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio, è stato visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio.

Isolamento virale

L'isolamento virale è stato eseguito sui campioni positivi alla RT-PCR. Come substrato sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo, preparate a partire da embrioni di pollo SPF al 18-20° giorno di incubazione (5). Le colture erano ritenute positive se si osservava ciliostasi entro 10 giorni dalla inoculazione. La conferma dell'isolamento di APV era ottenuta mediante RT-PCR.

Risultati

I campioni 259-01/03 e 259-02/03, eseguiti nel capannone 3 sono risultati positivi per APV sottotipo A rispettivamente all'isolamento virale ed alla nested RT-PCR (Figura 1). Sono risultati negativi i campioni eseguiti nel capannone 4.

Discussione

I nostri risultati mostrano per la prima volta la presenza di Pneumovirus aviare sottotipo A (APV-A) in Italia, dove sino ad ora era stato evidenziato il sottotipo B (APV-B) (7;2). Per diversi anni si è creduto che APV-A fosse presente in Gran Bretagna e in Sud Africa e che il B circolasse solo in Europa continentale. Studi più recenti, invece, hanno dimostrato la comparsa di quest'ultimo nel Regno Unito (8) e la presenza di APV-A in Europa continentale già alla fine degli anni '80 (6). Difficile è definire se il sottotipo A in Italia sia una nuova introduzione o se già da tempo circolasse nei nostri allevamenti: il focolaio riportato, infatti, si è verificato in un'area geografica da cui non risultano precedenti segnalazioni di isolamenti e tipizzazioni molecolari di APV. Ulteriori indagini sono necessarie a completare il quadro epidemiologico italiano che appare al momento frammentario.

L'osservazione di un focolaio di TRT in soggetti vaccinati si somma alle frequenti osservazioni di campo di rotture vaccinali imputate alternativamente ai metodi e ai piani vaccinali piuttosto che alla possibile reversione del vaccino o alla non completa cross protezione fra i sottotipi A e B. Anche se i dati sperimentali relativi a questo ultimo aspetto mostrano come ci sia una ottima protezione fra ceppi omologhi e buona fra eterologhi (8;10), le contrastanti osservazioni di campo richiedono ulteriori approfondimenti.

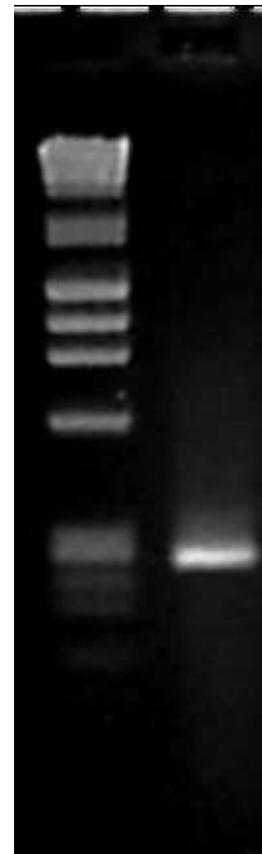
Bibliografia

1. Bayon-Auboyer M.H., Jestin V., Toquin D., Cherbonnel M., Etteradossi N. (1999). "Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus". Archives of Virology, 144, 1091-1109.
2. Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Marco M.A., Ortali G., Franciosi C., Naylor C.J. (2003). "Avian pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey". Abstract XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association, July 19-23, 2003, Denver-Colorado (USA). Abstract n.92, p.154.
3. Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Matteo P., DeMarco M.A., Ortali G., Pesente P., Sarti L., Franciosi C. (2002). "Infezione da pneumovirus aviare nel tacchino da carne e nel broiler: indagini di campo". Large Animals Review, 8 (6),109-110.

4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). "Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions". Avian Pathology, 28, 593-605.
5. Cook, J.K.A., Darbyshire J.H., 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.
6. Hafez H.M., Hess M., Prusas C., Naylor C.J., Cavanagh D. (2000). "Presence of Avian Pneumovirus Type A in Continental Europe During the 1980s". Journal Veterinary Medicine B, 47, 629-663.
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.
8. Naylor C.J., Shaw K., Brown P., Cavanagh D. (1997). "Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain". Avian Pathology, 26, 327-338.
9. Seal B.S. (1998). "Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first U.S. avian pneumovirus isolate is distinct from European subtypes". Virus Research, 58, 45-52.
10. Van de Zande S., Nauwynck H., Naylor C.J., Pensaert M., (2000) "Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys". Veterinary Record, 147, 132-134.

Figura 1: Elettroforesi in gel di agarosio. DNA Marker (lane 1) e DNA prodotto della nested RT-PCR per APV del campione 259-02/03 (lane 2). L'amplificato è di circa 300 bp.

Figure 1: Agarose gel electrophoresis. DNA size marker (lane 1) and DNA product obtained after Nested RT-PCR for APV with sample 259-01/03 (lane 2). The DNA product is about 300 bases in length.



COMUNICAZIONE 29

UTILIZZO DEL TOLTRAZURIL® NEL CONTROLLO DELLA COCCIDIOSI DEL POLLO DA CARNE

G. Grilli¹, N. Giussani¹, R. Ceruti², L. Gavazzi², A.M. Pisoni¹, V. Ferrazzi¹, D. Gallazzi¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 – 20133 MI; ²Gruppo Amadori, Cesena (FO)

Parole chiave: broiler, coccidi, terapia

Use of toltrazuril treatment for the control of broiler coccidiosis

Key words: broiler, coccidiosis, therapy

Summary: The AA. reported the effect of a therapeutic medication with toltrazuril on control of coccidiosis and broiler performance in absence of coccidiostat medicated feed. A total of 250.000 broilers of three different poultry farms were treated with toltrazuril at 7mg/BW daily in the drinking water at 19 and 20 days of age. Oocysts monitoring in the feces starting from the first week of age has been carried on at weekly intervals till the slaughter. The toltrazuril single treatment controlled coccidiosis and oocysts shedding that dropped at 35 days of age. Our results further indicate that in case of early coccidiosis challenge the treatment should be anticipated between 10-14 days in order to avoid early coccidiosis damages.

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

Introduzione

La coccidiosi è una malattia parassitaria che interessa l'allevamento avicolo in tutto il mondo e che causa ancora gravi danni. Per controllare razionalmente la coccidiosi si fa ricorso al vaccino o a farmaci specifici, oggi per lo più somministrati nel mangime come chemioprolattici. Le diverse molecole utilizzate sono attive contro differenti stadi evolutivi dei coccidi. Qualora si vogliono utilizzare programmi volti ad attivare l'immunità si sceglieranno principi attivi che agiscono su stadi avanzati del ciclo, così che venga stimolata la risposta immunitaria (2). In questo lavoro si è valutato, in condizioni di campo, il controllo della coccidiosi in broilers trattati per soli due giorni con toltrazuril[®], triazintrione ad ampio spettro, efficace contro tutte le specie patogene di coccidi del pollo (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. tenella*) e del tacchino (*E. adenoides*, *E. meleagridis*).

Materiali e Metodi

L'indagine è stata svolta in autunno presso tre allevamenti veneti di una grande azienda avicola nazionale, qui indicati come A (2 capannoni), B (4 capannoni) e C (8 capannoni). In totale gli animali allevati ammontavano a 250.000 circa; si trattava di ibridi Ross 508 di sesso misto allevati per un periodo di circa 40 giorni (tipologia leggera). L'alimentazione di questi animali era interamente basata su dieta vegetale, senza utilizzo di auxinici e anticoccidici nel mangime. In tutti gli allevamenti la densità dei pulcini risultava omogenea (circa 14 soggetti/mq). Per il controllo della coccidiosi è stato utilizzato toltrazuril[®] alla dose di 7 mg/kg peso vivo, somministrato in acqua da bere per due giorni consecutivi a partire dal 19° giorno di vita degli ultimi pulcini accasati per allevamento. I controlli, effettuati allo scopo di valutare la presenza di oocisti nelle feci, sono stati eseguiti a 7, 14, 21, 28 e 35 giorni di vita in ogni capannone degli allevamenti controllati. Ogni prelievo consisteva nella raccolta di circa 60 campioni di feci normali e ciecali in rapporto di circa 7:1 per ogni capannone. Il controllo copromicroscopico è stato effettuato attraverso la metodica di McMaster al fine di valutare il numero di oocisti per grammo di feci. Inoltre, per individuare le specie coccidiche presenti nei vari allevamenti, alcuni campioni di ogni settimana venivano preparati, previa flottazione, per visualizzare la morfologia delle oocisti.

Di ogni allevamento venivano analizzate almeno 100 oocisti di cui sono state individuate le caratteristiche morfometriche attraverso il sistema computerizzato di analisi d'immagine Image-Pro Plus4.5 (Media Cybernetics®) collegato ad un microscopio ottico Olympus BX41. Per completezza di indagine, ed in particolare per il rilievo di eventuali lesioni da coccidiosi, è stato sottoposto ad accurata necropsia il 10% dei soggetti normalmente deceduti durante le fasi di allevamento.

Risultati

I broilers controllati nei tre allevamenti hanno fatto registrare le *performance* zootecniche riportate in Tabella 1. Tutti questi parametri rientrano nello standard aziendale per questo tipo di pollo; solo nell'allevamento B la mortalità è risultata più elevata a causa di problemi enterici neonatali, per altro prontamente risolti con un trattamento antibiotico appropriato (Amoxicillina+Colistina in acqua). I controlli effettuati sugli animali morti non hanno mai evidenziato lesioni ascrivibili a coccidiosi clinica o sub-clinica. In tutti gli allevamenti, i controlli inerenti la presenza di oocisti nelle feci, effettuati nelle prime due settimane di vita, hanno dato esito negativo, a parte qualche sporadico campione che presentava pochissime oocisti. Nelle settimane successive l'emissione di oocisti si è rivelata differente nell'allevamento A e B. Dell'allevamento C è stato possibile recuperare solo i dati delle prime tre settimane di vita.

Tabella 1: *performance* zootecniche dei gruppi trattati.
Table 1: *performance of treated group.*

Parametri	Allev. A	Allev. B	Allev. C
N. pulcini accasati	34.200	113.000	103.400
N. capi macellati	32.922	105.287	99.223
Età macellazione	40	40	42
kg prodotti	58.808	171.570	163.327
Peso medio	1,799	1,646	1,656
I.C.A.	1,743	1,797	1,785
% mortalità	3,74	6,91	4,03

Nella Figura 1 sono messe a confronto le medie dei tre allevamenti relative all'emissione delle oocisti. Dai dati relativi alla forma e alle dimensioni morfometriche (lunghezza, larghezza e loro rapporto) delle oocisti

misurate mediante il sistema computerizzato è risultato che nell'allevamento A e B erano presenti: *E. acervulina*, *E. mitis*, *E. praecox* ed *E. tenella*; nell'allevamento C alla terza settimana sono state ritrovate *E. acervulina*, *E. maxima* ed *E. mitis*.

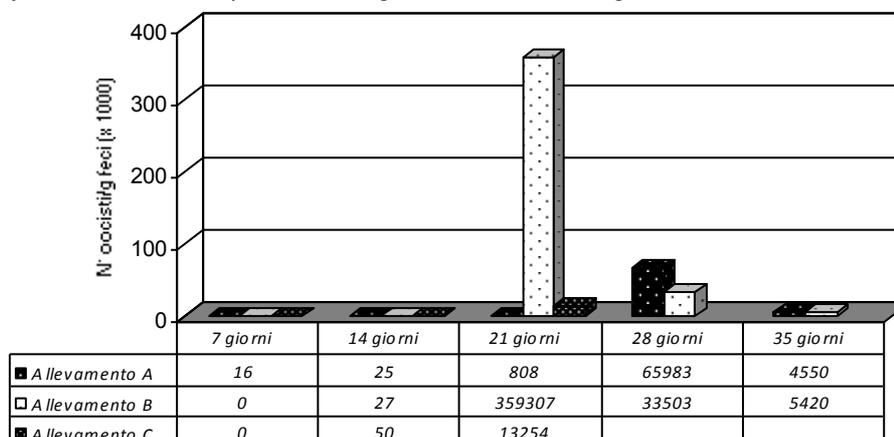
Discussione

Dalla Tabella 1 si evidenzia come i tre gruppi controllati abbiano dei risultati zootecnici lievemente differenti tra loro. Gli ICA sono simili e pure superiori allo standard dell'ibrido utilizzato. In un recente lavoro (6), si riportano diversi esempi inerenti la presenza di oocisti nelle lettiere di gruppi di broilers vaccinati o sottoposti a profilassi con farmaci anticoccidici; in questo lavoro il numero di oocisti/g feci si è sempre dimostrato superiore a quanto da noi trovato, sia in animali vaccinati che sottoposti a profilassi anticoccidica classica. Analizzando l'eliminazione delle oocisti nelle feci si è notato come nell'allevamento A il picco sia raggiunto al 28° giorno di vita con più di 100.000 oocisti, come avviene normalmente negli allevamenti industriali. Situazione diversa invece viene riscontrata nell'allevamento B, dove il picco di emissione dei coccidi è avvenuto al 21° giorno ed è risultato quantitativamente più elevato (359.000 oocisti/g feci). Purtroppo non è stato possibile seguire il terzo allevamento per tutto il ciclo, ma dai 3 controlli effettuati, anche in questo si è evidenziata la comparsa delle prime oocisti a 21 giorni di vita, pur se quantitativamente molto inferiori (13.200 oocisti/g feci) rispetto all'allevamento B. Il maggior grado di infezione coccidica di questo ultimo allevamento potrebbe essere in correlazione con la patologia enterica neonatale, causa di peggioramento delle caratteristiche fisiche della lettiera (> umidità), che notoriamente favoriscono i coccidi. La Figura 1 mette ben in evidenza le differenze riscontrate tra i tre allevamenti controllati, ascrivibili alle differenti condizioni sanitarie e ambientali, ma anche alla possibilità che l'infezione nei tre allevamenti sia causata da specie coccidiche diverse.

Negli allevamenti avicoli di grandi dimensioni può accadere che i pulcini non siano accasati contemporaneamente, ma nell'arco di 3-4 giorni, mentre il trattamento con l'anticoccidico avviene in contemporanea per tutti i capannoni come nel nostro caso. Osservando separatamente i risultati ottenuti nei diversi capannoni dello stesso allevamento, si è notato la differenza anche notevole nell'emissione di oocisti.

Figura 1: Andamento dell'emissioni di oocisti - Confronto tra i 3 allevamenti.

Figure 1: Oocysts excretion - Comparison among the different breedings



Tenuto conto che il ciclo coccidico è di 6-7 giorni, il ritardo del trattamento anche di un solo giorno può aumentare l'infezione e provocare quindi il ritrovamento di più oocisti in un capannone rispetto ad un altro. Nelle nostre osservazioni, in aggiunta alla conta delle oocisti nelle feci, abbiamo preso in considerazione anche lo stato sanitario e le performance produttive di tutti i gruppi. L'insieme di questi parametri è sicuramente sufficiente per trarre alcune considerazioni su questa procedura di controllo della coccidiosi nei broilers. Si conferma l'efficacia del toltrazuril nei confronti della coccidiosi del pollo da carne allevato in campo, come già segnalato da Papparella *et al.* (3), Chapman (1), Vertommen *et al.* (5) e Ramadam *et al.*(4). Nelle condizioni di campo controllate, in allevamenti che producono un pollo leggero e macellato intorno a 40 giorni, può essere sufficiente un solo trattamento che, alla luce di quanto sopra, andrebbe anticipato a 10-14 giorni di età, rispetto a quanto da noi eseguito. Il trattamento anticipato limita, infatti, lo sviluppo precoce dei coccidi, senza interferire sui meccanismi di induzione dell'immunità, prevenendo così i danni precoci difficilmente compensabili della coccidiosi. In polli a ciclo lungo (broilers pesanti o galletti), considerando le diverse dinamiche temporali di sviluppo delle varie specie di coccidi coinvolti, sarebbe opportuno effettuare un secondo trattamento dopo 2-4 settimane.

Bibliografia

1. Chapman H.D. (1987) Control of a line of *E. tenella*, partly resistant to monensin by including toltrazuril discontinuously in the drinking water of chickens.
2. MC Dougald L.R., Reid W.M. (1997B) Coccidiosis In "Diseases of Poultry." Calnek B.W. eds. 10th ed.,Iowa State University Press, Ames Iowa, USA.
3. Papparella V., Cringoli G., Rossi M. (1986) Anticoccidial efficacy of Bay Vi 9142 (toltrazuril) in the drinking water of broilers. Atti SISVet 39: 2, 736-740.
4. Ramadam A., Abo El-Sooud K., El-Bahy M. M. (1997) Anticoccidial efficacy of toltrazuril and halofuginone against *Eimeria tenella* infection in broiler chickens in Egypt. Research in Veterinary Science 62: 2, 175-178.
5. Vertommen M. H., Peek H.W., Laan A., Van Der (1990) Efficacy of toltrazuril in broilers and development of a laboratory model for sensitivity testing of *Eimeria* field isolates. Veterinary Quarterly 12: 3, 183-192.
6. Williams R.B. (2002) anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. Avian Pathology 31: 317-353.

COMUNICAZIONE 30

LESIONI PODALI E BENESSERE DEL BROILER: OSSERVAZIONI PRELIMINARI

G. Grilli, L. Gavazzi, G. Manarolla, V. Ferrazzi, D. Gallazzi

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 – 20133 MILANO

Parole chiave: broiler, pododermatite, benessere

Foot pad-dermatitis and welfare in broiler chickens

Key words: foot-pad dermatitis, welfare

Summary: An attempt to classify broiler foot health status using the method developed in Swedish (Ekstrand *et al.*, 1997) for the control of foot-pad dermatitis was carried out. Italian market demands heavy broilers (3.5 kg and more), at 56 days of age. In this condition the foot-pad dermatitis is frequent as consequence of feed composition, litter material, stocking density and climatic conditions. Foot-pad dermatitis evaluation and classification of lesions at slaughter-house are very difficult. Gross and histological lesions are not always comparable.

Correspondance: Guido Grilli, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Anatomia Patologica e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano, e-mail: guido.grilli@unimi.it

Introduzione

Recentemente in seno al comitato veterinario dell'UE si stanno mettendo a punto dei parametri in grado di valutare il benessere del broiler e del tacchino di allevamento intensivo. La dermatite podale è uno dei parametri più attentamente valutati a questo proposito da molti Autori, in quanto considerata da tempo un ottimo indice di valutazione delle condizioni di allevamento (7, 9). La pododermatite è una dermatite da contatto che negli stadi precoci causa depigmentazione della cute, ipercheratosi e necrosi dell'epidermide. Le lesioni possono essere superficiali e quindi non influenzare il normale ritmo di crescita del broiler né il suo stato sanitario. Nei casi più gravi, le erosioni superficiali possono progredire fino a diventare ulcere, causando dolore agli animali e difficoltà di deambulazione con inevitabile scadimento dello stato sanitario e delle *performance* zootecniche. In questo caso la soluzione di continuo della cute podale può agevolare le infezioni batteriche degli strati più profondi, soprattutto la stafilococcosi. In caso di guarigione, gli strati cutanei risultano più sottili e di colore più chiaro (6). L'etiologia di questa forma patologica è varia e spesso provocata da più cause concomitanti. Tra i maggiori fattori di rischio sicuramente figura la qualità della lettiera, correlata alla densità degli animali allevati ed alle infezioni enteriche, specialmente neonatali. Più volte si è constatato come l'utilizzo di truciol di legno determini una prevalenza inferiore di dermatite podale rispetto ad una lettiera a base di paglia, meno igroscopica e più traumatica. Oltre al materiale, più o meno assorbente, utilizzato come lettiera è importante anche il tasso di umidità, notoriamente influenzato sia dalle condizioni climatiche, sia dai sistemi di abbeverata e di ventilazione. Anche l'alimentazione può influenzare l'incidenza delle lesioni podali. Oloyo nel 1991 (8) ha dimostrato come la carenza di biotina e/o riboflavina possa incrementare tali lesioni, e come l'aggiunta di metionina ne diminuisca l'incidenza. L'utilizzo di mangimi con un eccesso di soia può influenzare indirettamente le lesioni, provocando una variazione della consistenza delle feci, che diventano più viscosi, con deterioramento qualitativo della lettiera. Quando sono stati vietati i mangimi contenenti farine di carne ed ossa nell'UE, la variazione improvvisa della composizione della dieta ha peggiorato la qualità della lettiera, con aumento di lesioni podali (1). Bruce (2)

sostiene che queste lesioni non sembrerebbero legate alla linea genetica, al sesso e all'età di macellazione.

Già da alcuni anni, in Svezia, Ekstrand *et al.* (3,4,5) hanno proposto un sistema di valutazione delle pododermatiti come indicatore dello standard manageriale, igienico e di allevamento. Questo programma di monitoraggio prevede la valutazione delle pododermatiti al momento della macellazione. Le lesioni vengono classificate in base ad un protocollo che prevede punteggi differenti a seconda della gravità delle lesioni. Queste osservazioni devono essere ovviamente eseguite da personale appositamente addestrato.

La nostra ricerca si propone di valutare l'applicabilità di questo sistema di monitoraggio come indice di benessere alle condizioni dell'avicoltura italiana.

Materiali e Metodi

Nella primavera 2003 sono state condotte alcune osservazioni sulla pododermatite di broiler, sia a pigmentazione gialla che bianca, regolarmente macellati e provenienti da macelli situati in Lombardia ed Emilia Romagna. Questi campioni sono stati valutati macroscopicamente e istologicamente distinguendo le tre differenti classi di Ekstrand *et al.* (4), per cui le lesioni sono state così classificate: classe 0 – lesioni assenti o presenza di modica ipercheratosi talvolta pigmentata, decolorazione cutanea o lieve erosione cutanea superficiale; classe 1 – erosioni più marcate, di dimensioni > 1 cm, ipercheratosi con necrosi superficiale localizzata; classe 2 – lesioni più marcate, cute ulcerata anche in più punti. Il controllo delle lesioni podali fa parte di un programma usato in Svezia per regolare la densità di allevamento: al macello si controlla la cute plantare di 1 zampa per 100 polli/gruppo macellato. Il punteggio raggiunto dalla somma delle lesioni riscontrate (Σ classe 0 x 0 + classe 1 x 0,5 + classe 2 x 2) deve essere pari o inferiore a 40, pena la riduzione di densità per il successivo gruppo allevato (da -1 a -3 kg/mq). Una volta predisposto il metodo di classificazione simile, abbiamo cercato di valutare l'applicabilità presso un macello avicolo del nord Italia, la cui capacità di macellazione è di 32.000 polli pesanti al giorno con una velocità di scorrimento della catena di macellazione di 90 polli/minuto. In questo contesto, per rendere più veloce il controllo, tre operatori esperti, indipendentemente l'uno dall'altro, hanno condotto le valutazioni, direttamente in catena,

osservando 120 polli/partita, confrontando quindi il risultato finale del punteggio. Le osservazioni sulla catena di macellazione sono state eseguite, per ogni partita, in più riprese di 20" l'una (30 polli contrattati per volta). Per confermare a posteriori il risultato dell'osservazione sulla catena è stato anche raccolto un campione di zampe al punto di taglio.

Risultati

Il risultato di tutte le osservazioni dirette, effettuate al passaggio dei polli sulla catena di macellazione, è stato relativamente omogeneo (scarto max di 3 punti per operatore e mai superiore, per lotto, al valore-soglia di 40). Abbiamo concentrato l'attenzione sulla valutazione della gravità dell'eventuale pododermatite che così è stata riportata: classe 0 - assenza di lesioni o presenza di lesioni che istologicamente non raggiungono lo strato germinativo (Figg. 1a, 1b e 1c); classe 1 - lesioni più evidenti con ispessimento dello strato cheratinizzato e infiltrati flogistici (Figg. 2a, 2b e 2c); classe 2 - lesioni necrotico-uceroze che interessano anche le falangi; in questo controllo preliminare è stato riscontrato solo in polli a cute bianca allevati su paglia (figg. 3a e 3b).

Discussione

Il tipo di classificazione delle lesioni podali in funzione della valutazione del benessere del pollo da carne, come proposto da Ekstrand *et al.* (3) sembra essere applicabile anche alle condizioni italiane. Le poche modifiche al programma originale da noi apportate riguardano la classificazione della classe 0, che raggruppa anche lesioni lievi, che al controllo istologico non compromettano l'integrità totale dello strato di cheratina. Le difficoltà operative riscontrate riguardano principalmente la velocità di scorrimento della catena che può indurre ad una valutazione scorretta. Solo per la brevità del controllo da noi effettuato, eseguito da persone molto esperte, non è stata evidenziata variabilità significativa, ma sembra veramente problematico un giudizio oggettivo,

direttamente osservando i polli in catena, per l'indubbio effetto ipnotico insito in operazioni prolungate e, come questa, estremamente ripetitive. Un altro punto debole potrebbe riguardare la preparazione del personale addetto al controllo, che dovrà essere adeguatamente preparato. La fase successiva di questo nostro lavoro sarà quella di cercare di applicare questo modello su vasta scala, tenendo conto dell'elevata variabilità di allevamento che caratterizza il patrimonio avicolo da carne nazionale (polli macellati a età e pesi differenti, tipi di lettiera, climi diversi ecc.) per ottenere un giudizio il più possibile oggettivo.

Bibliografia

1. Berg C., 2002. Dermatite nel broiler e nel tacchino: epidemiologia ed efficacia degli interventi. *Large Animal Review*, 8 (6):55-57.
2. Bruce D.W., McIlroy S.G., Goodall E.A., 1990. Epidemiology of a contact dermatitis of broilers. *Avian Pathology*, 19 (3): 523-538.
3. Ekstrand C., Carpenter T.E., Algers B., 1997. A surveillance programme for foot-pad dermatitis in Swedish broilers. *Epidémiologie Santé Animale*, 31-32.
4. Ekstrand C. *et al* 1997. Rearing conditions and foot-pad dermatitis in Swedish broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine* 31:167-174.
5. Ekstrand C., Carpenter T.E., Andersson I., Algers B., 1998. Prevalence and control of foot-pad dermatitis in broilers in Sweden. *British Poultry Science*, 39:318-324.
6. Green J.A., McCracken R.M., Evans R.T., 1985. A contact dermatitis in broilers - clinical and pathological finding. *Avian Pathology*, 14 (1):23-38.
7. Nairn M. E. e Watson A.R.A. 1972. Leg weakness of poultry: A clinical and pathological characterisation. *Australian Veterinary Journal*, 48(12). 645-656.
8. Oloyo .A., 1991. Responses of broilers fed guineacorn/palm kernel mealbased ration to supplemental biotin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55 (4):539-550.
9. Schmidt V. e Luders H. 1976. Ulcerations of the sole and toe pads of fattened turkey cocks. *Berlin Munchen Tierärztlicher Wochenschrift* 89(3):47-50.

Figure. 1a, 1b, 1c. Cute plantare di broiler. Classe 0: lesione modica dello strato cheratinico

Figures 1a, 1b, 1c Foot scoring. Class 0: mild lesions of the epidermal layer



Figure. 2a, 2b, 2c. Cute plantare di broiler. Classe 1: ipercheratosi con infiltrati flogistici

Figures 2a, 2b, 2c. Foot scoring. Class 1: hyperkeratosis and inflammatory reaction.



Figure 3a, 3b. Classe 2. Cute plantare di broiler: diffusa dermatite necrotico-ulcerosa, lesioni diffuse.

Figures 3a, 3b. Foot scoring. Class 2: severe ulceration and necrosis

