

## COMUNICAZIONE 18

### PRIMO ISOLAMENTO DI *BRACHYSPIRA INTERMEDIA* DAL POLLO IN ITALIA

L. Bano<sup>1,2</sup>, D. Comin<sup>1</sup>, F. Agnoletti<sup>1</sup>, M. Merola<sup>3</sup>, P. Bonilauri<sup>4</sup>, G. Meriardi<sup>4</sup>

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

<sup>4</sup>IZS 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](mailto: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% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>), 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

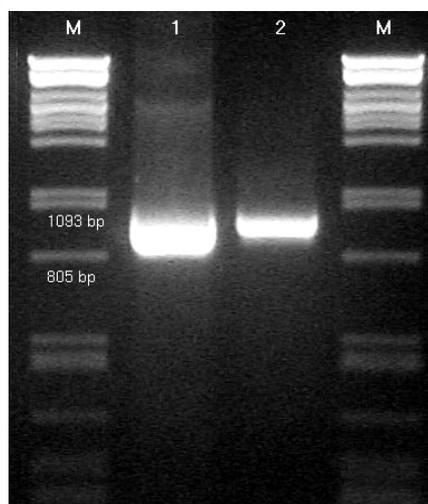
Table 1. Used primers

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 <sup>c</sup> (forward) 5'-CATAAGTAGAGTAGAGGAAAGTTTT-3' IV <sup>d</sup> (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 (xilanasi 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.