

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, pathogenicity

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 (spectinomina, 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