

CONTAMINAZIONI MICROBICHE DEL SACCO VITELLINO DI PULCINI DI UN GIORNO E VALUTAZIONE DELLA FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS* SPP.

Bano L., Berto G., Viel L., Drigo I., Bacchin C., Moret C., Puiatti C., Furlan G., Fracas V., Agnoletti F.

*Laboratorio di Batteriologia Speciale,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Villorba, Treviso*

Summary

Bacteriological examination of the yolk sac of 200 day-old chicks revealed a high rate of contamination, mainly due to *Enterococcus* spp. and *E. coli*.

E. faecalis, *E. gallinarum* and *E. faecium* have been the most frequently Enterococci species isolated and the drug susceptibility of 24 strains has been investigated by broth dilution method. The tested strains showed to be susceptible to penicillin and amoxicillin and resistant to tiamulin. Susceptibility to macrolides (tylosin, tilmicosin) resulted linked to the species. In addition, the majority of the strains resulted resistant to tetracycline.

INTRODUZIONE

Durante il secondo giorno d'incubazione dell'uovo, il tuorlo viene circondato da membrane extraembrionali dando origine al sacco vitellino che, attraverso una ricca vascolarizzazione, provvederà a fornire all'embrione i nutrienti necessari al suo sviluppo. Due giorni prima della schiusa il sacco vitellino viene inglobato all'interno della cavità celomatica garantendo una riserva energetica per il pulcino nelle prime 24 ore di vita. La completa scomparsa del residuo del sacco vitellino avverrà tra il 10° e il 14° giorno di vita, a seconda di molteplici fattori tra i quali riveste una particolare importanza la rapidità con la quale il pulcino acquisisce la funzionalità digestiva (Buhr *et al.* 2006). Grazie alla ricchezza di sostanze nutritive, il contenuto del sacco vitellino rappresenta un ottimo substrato per lo sviluppo di molteplici specie microbiche. Tra queste le più comunemente isolate sono *Escherichia coli* ed *Enterococcus* spp. anche se non mancano segnalazioni di contaminazioni del sacco vitellino ad opera di *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Aspergillus* spp. (Buhr *et al.* 2006; Listera and Barrow, 2008; Cortes *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004). L'infiammazione dell'ombelico prende il nome di "onfalite" ed è accompagnata da infezione microbica del sacco vitellino. L'onfalite è tra le prime cause di mortalità neonatale e viene solitamente contenuta attraverso la somministrazione di antibatterici nei primi giorni di vita del pulcino (Terregino *et al.* 2000; Listera and Barrow, 2008). Tra i fattori che possono influenzare un'incompleta cicatrizzazione ombelicale e l'insorgenza di onfalite si segnalano condizioni ambientali non ottimali quali bassa concentrazione atmosferica d'ossigeno, elevata temperatura e umidità relativa.

Sebbene siano molteplici le informazioni presenti in letteratura circa le specie microbiche contaminanti i sacchi vitellini di soggetti deceduti in seguito ad onfalite, sono scarsi i dati che riguardano lo stato di contaminazione microbica di questi

importanti residui embrionali in soggetti sani. Di seguito vengono riportati i risultati di un'indagine batteriologica eseguita su gruppi di pulcini sani di 1 giorno di vita, destinati alla produzione della carne, e i risultati di farmacosenibilità di ceppi di *Enterococcus* spp. isolati dal sacco vitellino.

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'indagine ha riguardato 50 gruppi di pulcini di 1 giorno, selezionati casualmente tra quelli conferiti in vita al laboratorio diagnostico nel corso del 2013 per accertamenti sierologici e batteriologici routinari. I gruppi, omogenei per età, erano costituiti da 10 soggetti tra i quali sono stati individuati da 3 a 10 pulcini (mediamente 4) da sottoporre ad accertamenti batteriologici. In totale sono stati analizzati 200 soggetti. I gruppi di pulcini erano destinati ad allevamenti commerciali e provenivano da incubatoi diversi non segnalati al momento del conferimento. Non è noto se i soggetti fossero stati sottoposti a trattamenti farmacologici durante le consuete vaccinazioni "in ovo" o subito dopo la schiusa.

Accertamenti batteriologici

I pulcini sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e successivamente scuoiati per mettere in evidenza il sacco vitellino, attraverso il sottocute addominale. Il prelievo dal sacco vitellino è stato eseguito impiegando un tampone cotonato sterile, previa cauterizzazione dei tessuti incisi con bisturi sterile. Per l'esame colturale sono stati utilizzati i seguenti terreni: agar sangue esulina (ASE), eosin methylene blue agar (EMB), phenylethyl alcohol agar addizionato con 5% di sangue di montone (PEAA) e heart infusion broth (HIB). EMB e ASE sono stati posti a 37 °C in condizione di aerobiosi mentre una seconda piastra di ASE e i restanti terreni sono stati incubati a 37 °C in condizioni di microaerofilia (5% CO₂). I terreni sono stati ispezionati a 24 e 48 ore e, in caso di mancata crescita dopo 24 ore, si è proceduto all'esecuzione di un esame batteriologico indiretto a partire dall'HIB, secondo le stesse modalità sopra riportate. Colonie morfologicamente diverse sono state isolate ed identificate a livello di specie attraverso tecniche di batteriologia classica o MALDI TOF (Bruker Daltonics).

Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)

Dieci ceppi di *Enterococcus faecalis*, 10 di *Enterococcus gallinarum* e 4 di *Enterococcus faecium* isolati da sacchi vitellini, sono stati sottoposti a test di farmacosenibilità attraverso il metodo della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), eseguita con diluizioni scalari del principio attivo in brodo, come previsto per *Enterococcus* spp. nei manuali internazionali di riferimento (CLSI, 2013). I principi attivi impiegati nel test sono stati amoxicillina, tilosina, tiamulina, tilmicosina, penicillina e ossitetraciclina. Per *E. faecalis* e *E. galinarum* sono stati calcolati i valori di MIC₅₀ e MIC₉₀.

RISULTATI

Esame batteriologico

Quarantuno dei 50 gruppi testati (82%) comprendevano almeno un soggetto risultato positivo all'esame batteriologico. In totale 109/200 (54,5%) soggetti hanno presentato contaminazione del sacco vitellino da parte di 1 o più specie batteriche.

In particolare 5 soggetti sono risultati contaminati simultaneamente da 3 specie batteriche diverse e 36 soggetti da 2 specie. In totale sono stati isolati 156 ceppi batterici e 73 di questi appartenevano al genere *Enterococcus* (58 *E. faecalis*, 11 *E. gallinarum*, 4 *E. faecium*). *Escherichia coli* è risultata la seconda specie in termini di frequenza d'isolamento con 61 soggetti positivi. Sporadicamente sono state isolate altre specie batteriche considerate causa di onfalite del pulcino quali *Stafilococchi* coagulasi positivi (2) (*S. aureus*, *S. delphini*), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Proteus mirabilis* (7), *Klebsiella pneumoniae* (3) ed *Enterobacter cloacae* (2). Inoltre vi sono stati occasionali isolamenti di specie batteriche il cui ruolo nelle infezioni ombelicali del pulcino non è noto quali *Brevundimonas diminuta* (1), *Penibacillus lactis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1), *Staphylococcus gallinarum* (1), *Staphylococcus hominis* (1) e *Staphylococcus xylosus* (2).

Sensibilità di *Enterococcus* spp. agli antibiotici

I risultati dei test di farmacosenibilità vengono riportati in tabella 1.

Tutti i ceppi testati sono risultati sensibili a penicillina e amoxicillina in base al breakpoint (8 µg/ml), comune a tutti i membri appartenenti al genere *Enterococcus* spp. (CLSI, 2013). Per tali molecole non si sono osservate differenze nella distribuzione dei valori di MIC tra le tre specie testate. Per quanto riguarda la tilosina, considerando il breakpoint pari a 1 µg/ml (NARMS, 2010), è possibile notare differenze sostanziali tra le diverse specie batteriche. Infatti, tutti i ceppi di *E. faecalis* ed *E. faecium*, con un'unica eccezione, si sono dimostrati resistenti (MIC₉₀ di *E. faecalis* > 256 µg/ml), mentre il valore di MIC₉₀ di *E. gallinarum* si è attestato a 1 µg/ml. Nel caso della tilmicosina non sono disponibili breakpoint e i valori di MIC₉₀ di *E. gallinarum* sono risultati sensibilmente inferiori rispetto a quelli di *E. faecalis* (16 µg/ml e >256 µg/ml rispettivamente). I valori di MIC della tiamulina nei confronti di *E. faecalis* e *E. gallinarum* si sono dimostrati elevati e sovrapponibili (MIC₉₀ = 256 µg/ml). Nel caso dell'ossitetraciclina è possibile osservare una distribuzione bimodale dei ceppi di *E. faecalis* ed *E. gallinarum* rispetto ai valori di MIC. In particolare è possibile distinguere una sub-popolazione di ceppi più numerosa che presenta valori di MIC compresi tra 32 µg/ml e 128 µg/ml e una più esigua che si attesta sul valore di 0,5 µg/ml. Gli enterococchi vengono definiti sensibili alle tetracicline per valori di MIC < a 4 µg/ml e resistenti con MIC > a 8 µg/ml (CLSI, 2013). In base a questi breakpoint la sub-popolazione più numerosa può essere considerata resistente alle tetracicline, mentre 3/4 ceppi di *E. faecium* hanno mostrato valori di MIC che si collocano nel range di sensibilità per le tetracicline.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presente indagine dimostra una diffusa contaminazione del sacco vitellino di pulcini sani di un giorno di vita ad opera di specie microbiche ritenute causa di onfalite e mortalità neonatale. È noto che il pulcino possa nascere già con il sacco vitellino contaminato da *Salmonella* o *E. coli* in seguito ad infezioni dell'ovaio della madre (Barns *et al.*, 2008), ma la presenza di flore microbiche fecali a trasmissione non verticale quali *Enterococcus* spp. nel sacco vitellino, a poche ore dalla nascita, può trovare giustificazione solo nelle scadenti condizioni igieniche dell'incubatoio. Anche l'incubazione di uova con elevato grado di contaminazione batterica del guscio o con incrinature, può concorrere a favorire la nascita di soggetti infetti.

Non si esclude che le stesse pratiche di vaccinazione “in ovo” di partite con guscio particolarmente imbrattato o eseguite con attrezzature infette possano facilitare una contaminazione interna dell’uovo, comportando mortalità embrionale o la nascita di soggetti infetti. E’ stato dimostrato inoltre che la contaminazione del sacco vitellino da parte di Enterococchi, pur non provocando sistematicamente un aumento della mortalità embrionale o perinatale, riduce in modo significativo l’assorbimento dei nutrienti e soprattutto degli anticorpi materni, favorendo la nascita di soggetti ipovitali e immunodepressi (Sander *et al.*, 1998).

I risultati di farmacosenibilità delle specie microbiche isolate più frequentemente nel corso del presente studio (Enterococchi), hanno rivelato una diffusa sensibilità nei confronti di farmaci definiti “di prima scelta” in terapia animale quali la penicillina e l’amoxicillina, indipendentemente dalla specie di *Enterococcus* spp. testata. Al contrario i macrolidi (tilosina, tilmicosina) e la tiamulina hanno dimostrato risultati incostanti e comunque legati alla specie batterica. In particolare quasi tutti i ceppi di *E. gallinarum* si sono dimostrati sensibili alla tilosina mentre i ceppi delle altre specie di Enterococchi resistenti. Nel caso dell’ossitetraciclina non vi sono state differenze significative di specie e i risultati sono simili a quelli riportati in bibliografia per *E. faecalis* (Furtula *et al.* 2013). Dato il frequente isolamento di *E. coli* è evidente che eventuali trattamenti farmacologici di gruppi affetti da onfalite dovrebbero comprendere anche farmaci attivi nei confronti di batteri Gram negativi, ma tali pratiche non possono sostituirsi a un rigoroso rispetto delle operazioni di pulizia e disinfezione in incubatoio.

BIBLIOGRAFIA

Barnes HJ, LK Nolan, Vaillencourt JP. (2008). Colibacillosis. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 703-705.

Buhr RJ, Northcutt JK, Richardson LJ, Cox NA, Fairchild BD. (2006). Incidence of unabsorbed yolk sacs in broilers, broiler breeder roosters, white leghorn hens, and Athens-Canadian random bred control broilers. *Poultry Sci.* 85:1294–1297.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Manual VET01-A4. Performances Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Fourth Edition.

Cortes PL, Shivaprasad HL, Kiupel M, Senties-Cué G. (2005). Omphalitis associated with *Aspergillus fumigatus* in poults. *Avian Dis.*, 49:304-308.

Furtula V, Jackson CR, Farrell EG, Barrett JB, Hiott LM, Chambers PA. (2013). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from environmental samples in an area of intensive poultry production. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10:1020-1036.

Khan KA, Khan SA, Aslam A, Rabbani M, Tipu MY. (2004). Factors contributing to yolk retention in poultry: a review. *Pakistan Vet. J.*, 24(1):46-51.

Lister SA., Barrow P. (2008). Enterobacteriaceae. In: Pattison M., McMullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ (Eds.), *Poultry diseases*, Saunders Elsevier press, Toronto, pp. 110-145.

NARMS—National Antimicrobial Resistance Monitoring System Animal Isolates, USDA. Available online: <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=22435>.

Sander EJ, Willingham EM, Wilson JL, Thayer SG. (1998). The effect of inoculating *Enterococcus faecalis* into the yolk sac on chick quality and maternal antibody absorption. *Avian Diseases*, 42, 359-363.

Terregino C, Catelli E, Zanoni R, Giordano S, Sanguinetti V. (2000). Considerazioni su cause di mortalità neonatale del pollo da carne. *Rivista di avicoltura*, 4:34-40.

Tabella 1. Risultati di MIC di *Enterococcus* spp. isolati dal sacco vitellino di pulcini di 1 giorno

µg/ml	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256	MIC 50	MIC 90
Penicillina																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	2	8	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	8	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicillina																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	1
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilosina																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	3	5	256	>256
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-
Tilmicosina																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	8	256	>256
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	8	1	-	-	-	-	1	8	16
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	-	-
Tiamulina																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	6	-	256	256
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	8	-	256	256
<i>E. faecium</i>	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Ossitetraciclina																
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	3	-	-	-	-	-	1	-	6	-	-	128	128
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3	5	1	-	-	64	64
<i>E. faecium</i>	-	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-

EPISODI DI COINFEZIONE CLOSTRIDICA IN OVAIOLE COMMERCIALI

Berto G., Agnoletti F., Drigo I., Tonon E., Vascellari M., Tarticchio G., Marcon B., Ferro T., Bano L.

Sezione Diagnostica di Treviso,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Villorba, Treviso

Summary

The present report describes two outbreaks of serious enteritis caused by *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) and *Clostridium colinum* (*C. colinum*) coinfection in commercial laying hens. At the age of 44 and 31 weeks, two laying hen flocks showed an increase of the mortality rate and a worsening of productive performance. Post-mortem examination revealed intestinal necrotic-hemorrhagic ulcerations and hepatic focal necrosis. The bacteriological examination yielded the isolation of *C. colinum* and *C. perfringens* toxinotype A, NetB positive. In one outbreak *C. colinum* was detected also by PCR in all the intestines of affected birds.

In laying hens *C. colinum* has never been isolated but its presence has been revealed by molecular techniques and associated with a slight enteric disease called duodenal focal necrosis. The present case report was characterized by severe enteritis presumably due to the synergistic effect of *C. colinum* and *C. perfringens*.

INTRODUZIONE

Le enteriti batteriche della gallina ovaiole (*Gallus gallus*) sono per lo più sostenute da microrganismi anaerobi appartenenti ai generi *Clostridium* e *Brachyspira* (1). Tra queste patologie la più frequente è rappresentata dall'enterite necrotica (EN), causata da *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), un bacillo anaerobio Gram positivo sporigeno che esplica la sua azione patogena attraverso la produzione di diversi tipi di tossine. *C. perfringens* viene classificato in 5 tossinotipi (A, B, C, D, E) in relazione alle diverse combinazioni di tossine maggiori prodotte. Storicamente l'EN è associata ai tossinotipi A e C (2), tuttavia ricerche condotte in diversi paesi hanno dimostrato l'implicazione del solo tossinotipo A (2, 3) caratterizzato dalla produzione di tossina α . In passato si riteneva che l' α -tossina, prodotta da tutti i ceppi di *C. perfringens*, fosse un fattore di virulenza indispensabile per la comparsa della malattia (4,5), ma oggi si sa che la sua presenza non è necessaria per la formazione del quadro lesivo tipico (6). La tossina ad oggi ritenuta più importante nell'eziopatogenesi dell'EN è una "pore-forming protein" denominata NetB (7). Il quadro clinico ed anatomopatologico può risultare più grave se i ceppi coinvolti risultano produttori anche di una tossina appartenente al gruppo delle "large clostridial cytotoxins" denominata TpeL (8). L'EN colpisce classicamente polli da carne d'età compresa fra 2 e 6 settimane di vita, anche se non mancano segnalazioni di patologia conclamata in pollastre e ovaiole commerciali di età compresa fra 3 e 9 mesi (9,10).

Altra patologia enterica ad eziologia clostridica del pollame è l'enterite ulcerativa (EU), sostenuta da *Clostridium colinum* (*C. colinum*), che colpisce prevalentemente il Colino della Virginia (*Colinus virginianus*), nel quale la patologia assume spesso carattere epidemico. L'infezione da *C. colinum* è stata segnalata anche nel pollo e riprodotta sperimentalmente (11). Anche in questo caso il batterio sembrerebbe

svolgere un ruolo patogeno unitamente a fattori predisponenti, fra i quali vanno considerati la coccidiosi, la malattia di Gumboro, l'anemia infettiva e fattori stressogeni (12). Nella gallina ovaiole *C. colinum* è stato associato ad una patologia che prende il nome di "duodenal focal necrosis" (DFN) in virtù della localizzazione delle lesioni necrotiche. In questa malattia la presenza di *C. colinum* è stata evidenziata solo mediante tecniche di biologia molecolare (DGGE, T-RFLP) ma il microrganismo non è stato mai isolato e le lesioni non sono mai state riprodotte sperimentalmente (13).

MATERIALI E METODI

Dati anamnestici

Nel corso del 2013 in un allevamento di galline ovaiole commerciale Hyline si sono osservati 2 episodi di malattia caratterizzati da un improvviso incremento della mortalità. Il primo episodio si è verificato in giugno ed ha riguardato un gruppo di 44000 soggetti di 47 settimane, il secondo si è verificato a dicembre in un gruppo 18300 soggetti di 31 settimane.

Entrambi i gruppi di animali erano stabulati in voliera e in capannoni diversi. L'allevatore riferiva un improvviso peggioramento delle performance produttive con una diminuzione della pezzatura dell'uovo, un calo del consumo alimentare e una mortalità dello 0,5 ‰. Nel gruppo di 31 settimane inoltre veniva segnalata la presenza di animali con sintomatologia gastroenterica localizzati solo in una parte del capannone.

Esami batteriologici

Gli accertamenti batteriologici eseguiti su organi con lesioni macroscopiche (principalmente fegato e intestino), sono stati condotti in agar sangue esculina (ASE), Perfringens agar base (PAB), cooked meat medium (CMM) ed eosin methylene blue (EMB). Le piastre di ASE ed EMB sono state incubate per 24 ore a 37 ± 1 °C in condizioni di aerobiosi mentre PAB, CMM e una seconda piastra di ASE sono stati incubati alla stessa temperatura in condizioni di anaerobiosi, per 24-48 ore. I terreni sono stati ispezionati dopo 24 e 48 ore. L'identificazione degli isolati è stata effettuata tramite MALDI-TOF MS (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics).

Accertamenti collaterali

Campioni di fegato con lesioni macroscopicamente evidenti sono stati sottoposti ad accertamenti virologici ed istopatologici. L'esame virologico è stato condotto tramite microscopia elettronica, isolamento in uova embrionate e colture cellulari convenzionali. Per l'accertamento istologico, porzioni di fegato e intestino sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sezionati a 4 μ m. Sulle sezioni ottenute è stata eseguita colorazione con ematossilina-eosina e i preparati sono stati osservati al microscopio ottico.

E' stato inoltre condotto un esame parassitologico tramite osservazione microscopica diretta di raschiati intestinali effettuati sia dal tenue che dai ciechi, a livello di lesioni macroscopiche.

Ricerca di *C. colinum* e tossinotipizzazione di *C. perfringens*

I ceppi di *C. perfringens* sono stati tossinotipizzati mediante multiplex-PCR (14) ed è stato ricercato il gene codificante la tossina NetB (15). E' stata inoltre indagata

tramite PCR la presenza di *C. colinum* in tratti intestinali interessati da lesioni evidenti (16).

RISULTATI

All'esame anatomo-patologico il quadro lesivo maggiormente caratteristico era rappresentato da enterite necrotico-ulcerativa a carico del tratto intestinale intermedio e dei ciechi (figura 1, A). Le lesioni erano tondeggianti, di diametro variabile (0,5 - 3 mm), con centro necrotico-emorragico, margini rilevati e occasionalmente coalescenti. Le ulcerazioni di maggiore diametro erano visibili anche attraverso la sierosa dell'intestino mentre in alcuni tratti della mucosa erano sporadicamente presenti aree necrotiche tondeggianti di 1-2 cm di diametro. In prossimità degli sbocchi ciecali si osservava la presenza di stampi caseosi costituiti da materiale necrotico mentre il lume del cieco era occupato da materiale patologico a carattere prevalentemente emorragico, originato da ulcerazioni disseminate sulla mucosa e visibili dopo lavaggio della stessa. Il fegato era interessato da epatite necrotica a focolai (figura 1, B) mentre le milze erano generalmente non reattive, pallide ma con soffiusioni emorragiche sulla superficie.

Istologicamente si rilevava enterite necrotica con vari stadi di erosione della mucosa, associata alla presenza di aggregati batterici ed infiltrazione linfoplasmocitaria diffusa. Il fegato era interessato da epatite eterofilico-necrotica multifocale associata ad aggregati batterici e steatosi diffusa degli epatociti. L'esame batteriologico ha portato all'isolamento di *C. perfringens* tossinotipo A in alta carica dall'intestino di soggetti di entrambi i gruppi. Alcuni ceppi di *C. perfringens* isolati nel corso del primo focolaio sono risultati anche positivi al gene codificante la tossina NetB. Dal fegato di un soggetto con lesioni necrotiche è stato possibile isolare *C. colinum* identificato sia tramite MALDI-TOF MS sia tramite PCR, mentre non sono state eseguite PCR dirette dal contenuto intestinale. Nel secondo gruppo in tutti gli intestini esaminati erano presenti sia *C. perfringens* che *C. colinum*. Gli accertamenti virologici hanno dato esito negativo mentre, all'esame parassitologico, è stata rilevata la presenza di scarse oocisti coccidiche solo in tre soggetti dei 12 esaminati.

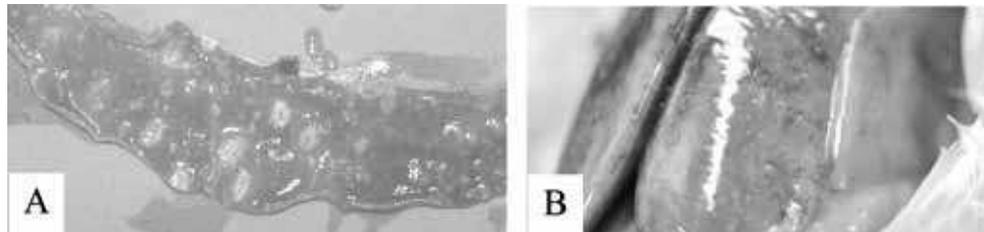


Figura 1. Enterite ulcerativa (A) ed epatite necrotica a focolai (B).

DISCUSSIONE

L'enterite necrotica è una malattia tipica del pollo da carne che sempre più frequentemente viene segnalata nell'ovaiola. La differente suscettibilità all'EN da parte di due categorie produttive appartenenti ad una stessa specie animale (broiler e ovaiole), va ricercata più nella possibilità che fattori predisponenti (es. coccidiosi) possano contribuire all'insorgenza della patologia o alla gravità con cui si manifesta piuttosto che in

una diversa sensibilità legata all'età dell'ospite. In ogni caso le lesioni che solitamente si osservano in episodi di EN dell'ovaiola, non raggiungono la gravità del quadro anatomopatologico precedentemente descritto. In entrambi i gruppi colpiti è stata rilevata la simultanea presenza di *C. perfringens* e di *C. colinum*. Alcuni ceppi isolati dal primo gruppo erano anche dotati del gene codificante la tossina NetB mentre la presenza di *C. colinum* non è stata inizialmente sospettata e quindi indagata direttamente dalle lesioni intestinali. L'inaspettato isolamento di *C. colinum* da fegato ha permesso di collegare successivamente le lesioni a un possibile caso di EU. Nel secondo caso, verificatosi a distanza di 6 mesi in un altro gruppo di ovaiole, la presenza di *C. colinum* è stata indagata direttamente tramite PCR permettendo di evidenziare la presenza di *C. colinum* in tutti i soggetti colpiti.

Nel presente caso clinico risulta impossibile stabilire con certezza a quale fra i due clostridi vada attribuito il ruolo eziologico primario, comunque è di particolare interesse l'isolamento di *C. colinum* da fegato che presentava le classiche lesioni necrotiche, solitamente segnalate in presenza di EU in altre specie animali. Le uniche segnalazioni di EU nell'ovaiola si riferiscono ad una duodenite necrotica focale in cui *C. colinum* non è mai stato isolato ma identificato tramite metodi molecolari. Una simultanea coinfezione di *C. colinum* e *C. perfringens* nella gallina ovaiole non è mai stata riportata. Nel colino della Virginia invece Beltran-Alcrudo *et al* 2007 (17) riporta l'isolamento di entrambi i batteri in un caso di enterite ulcerativa considerando *C. colinum* come agente primario della patologia ed attribuendo a *C. perfringens* un ruolo secondario.

In seguito alla diagnosi di clostridiosi intestinale gli animali sono stati trattati per 5 giorni con tilosina nell'acqua di bevanda (50 g/100 L). È noto che ceppi di *C. perfringens* isolati da ovaiole risultano sensibili alla tilosina (18) ma la mancanza di terreni selettivi per *C. colinum* rende difficoltoso l'isolamento da organi particolarmente contaminati e di conseguenza l'esecuzione dei test per la valutazione della sensibilità agli antimicrobici. Il fatto che dopo il trattamento si sia assistito ad una remissione della sintomatologia lascia ritenere che anche *C. colinum* possa essere sensibile a questa molecola.

BIBLIOGRAFIA

1. Hampson DJ, Swayne DE. (2008). Avian intestinal Spirochetosis. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 922-940.
2. Songer JG. (1996). Clostridial enteric disease of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(2):216-234
3. Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Laarveld B, Sawicki G. (2008). Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. *Res. Vet. Sci.* 85:543-553
4. Al-Shiekhly F, Truescott RB. (1977). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis.* 21: 230-240
5. Al-Shiekhly F, Truescott RB. (1977). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis.* 21:241-255

6. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson M M, Award M M, Rood JI, Moore RJ (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect. Immun.* 74(11): 6496-6500
7. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannma TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4:0001-0011
8. Coursodon CF, Glock RD, Moore KL, Cooper KK, Songer JG. (2012). TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaer.* 18:117-121
9. Kwatra YK, Lee YJ, Mo IP. (2004). A presumptive diagnosis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*) from Assam (India). *Avian Dis.* 20:401-406
10. Barnes HJ, Wages DP, Opengart K. (2008). Clostridial disease. In: Saif JM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th Edn., Blackwell Publishing, London, pp. 865-879.
11. Berkhoff GA, Campbell SG. (1973). Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis (quail disease). The experimental disease. *Avian Dis.* 18(2):205-2012
12. Davis RB. (1973). Ulcerative enteritis in chickens: coccidiosis and stress as predisposing factors. *Poult Sci.* 52:1283-1287
13. Baltzely TA, Dunham SM, Lago F, Rehberger TG, Siragusa GR. (2008). Molecular pathogenesis markers of focal duodenal necrosis in layer hens. Proceedings of the 80th Northeastern conference on Avian diseases.
14. Yoo HS, Lee SU, Park YH. (1997). Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin Microbiol.* 35:228-232
15. Baums CG, Schotte U, Amtberg G, Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol.* 100:11-16
16. Bano L, Drigo I, Macklin KS, Martin RS, Miller RS, Norton RA, Oyarzabal OA, Bilgili SF. (2008). Development of a polymerase chain reaction assay for specific identification of *Clostridium colinum*. *Avian Pathol.* 37:179-181
17. Beltran-Alcrudo D, Cardona C, McLellan L, Reimers N, Charlton B. (2008). A persistent outbreak of ulcerative enteritis in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.* 52:531-536
18. Bano L, Bacchin C, Marcon B, Fracas V, Giovanardi D, Drigo I, Agnoletti F. (2013) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* field strains isolated from commercial turkeys, broilers and layer hens. XIIIth WVPA (world veterinary pathology association) Congress. Nantes, FR, 19-23 settembre. p 672

FILOGENESI DI *CIRCOVIRUS* SULLA BASE DELLE SEQUENZE DEL GENOMA COMPLETO IDENTIFICATI IN SPECIE DIVERSE DI PAPPAGALLI

Caroli A., Pugliese N., Camarda A., Legretto M., Marino M., Circella E.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari.

ABSTRACT

BFDV, *Beak and Feather Disease Virus*, appartiene alla famiglia *Circoviridae* e al genere *Circovirus* (Bassami et al, 1998). A tale genere appartengono virus identificati in numerose altre specie come il suino, *Porcine Circovirus* (PCV-1, PCV-2) (Hamel et al, 1998), e virus identificati nei volatili, nel piccione *Pigeon Circovirus* (PiCV) (Mankertz et al, 2000), nell'oca *Goose Circovirus* (GoCV) (Todd et al, 2001b), nel canarino *Canary Circovirus* (CaCV) (Todd et al, 2001), nell'anatra *Duck Circovirus* (DuCV) (Todd et al, 2005), nel gabbiano *Gull Circovirus* (GuCV) (Twentyman et al, 1999), nel Diamante di Gould *Finch Circovirus* (FiCV) (Shivaprasad et al, 2004), nel corvo australiano *Australian raven Circovirus* (RaCV) (Stewart et al, 2006), nello storno *Starling Circovirus* (StCV) (Dayaram et al, 2013), e nel cigno *Swan Circovirus* (SwCV) (Halami et al, 2008).

BFDV è responsabile nei pappagalli di una patologia denominata "Malattia del becco e delle penne" (Psittacine Beak and Feather Disease – PBFD), in virtù della localizzazione tipica delle lesioni riscontrate a livello del becco e delle penne (Gerlach, 1994). La patologia se pur descritta inizialmente in popolazioni di pappagalli selvatici in Australia (Paré et Robert, 2007), attualmente l'infezione è segnalata in tutto il mondo nei pappagalli allevati in cattività a seguito del commercio globale di volatili esotici, ed è stata identificata in più di 60 specie di psittacidi (Varsani et al, 2011). Non sempre l'infezione evolve con sintomi specifici evidenti (Circella et al. 2012), ma classicamente la PBFD può manifestarsi in tre diverse forme cliniche, iperacuta, acuta e cronica, in base all'età dei volatili colpiti (Gerlach, 1994). Le lesioni a carico del becco e delle penne appaiono più frequentemente nelle evoluzioni croniche (Todd et Gortazar, 2012). L'infezione è associata ad immunosoppressione che espone i pappagalli all'insorgenza di infezioni secondarie (Todd, 2000).

Le diverse forme con cui la malattia si manifesta sono legate inoltre a numerosi e complessi fattori tra cui la specie colpita, il livello di anticorpi materni, i diversi stipiti coinvolti nell'infezione, la dose infettante e la co-presenza di altri agenti patogeni (de Kloet et de Kloet, 2004).

In questo lavoro sono stati analizzati geneticamente stipiti di *circovirus* identificati in pappagalli infetti appartenenti a specie diverse, provenienti da differenti località del centro e sud Italia (tabella 1) ed è stata valutata un'eventuale correlazione tra stipite virale e forma clinica osservata nel soggetto infetto.

Per l'amplificazione della regione *rep* sono state allestite due diverse reazioni di PCR, con due differenti coppie di primer, *BFDV2/4* (Ypelaar et al., 1999) e *DCiVf/r* (Todd et al., 2001), che amplificano due diverse regioni del gene che in parte si sovrappongono. L'intero genoma dei ceppi oggetto di studio è stato amplificato mediante la tecnica del circolo-rotante (Dean et al., 2001), o mediante primer