

CASI INSOSPETTATI DI PATOLOGIE SCHELETRICHE: DISPLASIA DEL FEMORE IN *THRESKIORNIS AETHIOPICUS* E DI FRATTURA DEL FEMORE IN *ARA MACAO*

Scaravelli D.¹, Massi P.², Tosi G.², Fiorentini L.²

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,
via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO)

² Istituto zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia
"Bruno Ubertain", via Marchini 1, 47122 Forlì

Summary

In an adult male of *Threskiornis aethiopicus* was found a displasia of the femur with diffuse periartritic areas and new-formations and in adult female *Ara macao* the fracture of the femur. Despite the gravity of the fracture both the two case go under silence in the two collections of derivation of the specimens. A strong attention and training have to be paid to the welfare of animals.

INTRODUZIONE

La presenza di fratture o altri danneggiamenti osteo-articolari, oltre ad essere una problematica ben conosciuta negli allevamenti, risulta anche documentata in ambito selvatico (ad es. Hart 1988).

Una delle particolarità che il gestore si trova di fronte occupandosi di specie selvatiche sia in zoo che in ambito naturale è la difficoltà di rilevare sintomatologie correlate a tutti gli stati patologici in quanto controsezionati dall'evoluzione, persino quando interessino fratture e lesioni gravi (Hart, 1988).

Diviene quindi difficile in molte situazioni, senza una specifica preparazione ed attenzione, rilevare stati patologici e si riportano due casi esemplificativi relativi.

MATERIALI E METODI

Due esemplari, un maschio adulto di *Threskiornis aethiopicus* e uno di femmina adulta di *Ara macao* morti di recente il primo in una collezione zoologica marchigiana e la seconda da una collezione siciliana per rilievi patologici e biologici all'Istituto zooprofilattico Sperimentale per la Lombardia e l'Emilia, sezione di Forlì.

Entrambi gli esemplari apparivano morti di setticemia da agenti eziologici diversi derivanti nel primo da ingestione di alimenti non propri sottratti ad altri animali e nel secondo per invasione da parte di batteri opportunisti a partire da una apparente ferita ad una gamba.

Oltre alle tecniche standard di indagini, per ragioni museali l'intero scheletro è stato preparato e evidenza di danni osteologici rilevati. Un'indagine quindi retrospettiva è stata effettuata presso i keeper nelle collezioni per verificare comportamenti e sintomatologie rilevate.

RISULTATI

Il primo caso ha visto il riscontro nel *T. aethiopicus* di una evidente displasia del femore sinistro con una diffusa osteoartrite che ha interessato il bacino e la testa del femore con deformazioni di entrambi a guisa di una forma articolare non funzionale. Questa situazione non risulta mai rilevata nella specie in esame, né in cattività, come in questo

caso, né in natura. Non è stato possibile capire quale la genesi di questa situazione, in quanto non rilevata dai keeper che hanno ritrovato appunto l'esemplare morto per altra infezione. Lo stato periartrico denota un lungo periodo, sicuramente di mesi, per la strutturazione delle rilevate deformazioni.

Il secondo caso ha visto il ritrovamento di una frattura del femore destro nella femmina di *Ara macao* con distacco delle due parti. La frattura mostra un evidente callo periostale che interessa entrambi i lembi del femore distaccati e che andava a recuperare anche la scheggiatura avvenuta in situ del tratto prossimale dello stesso.

Recuperando la storia dell'esemplare risultava un attacco da parte del maschio della coppia nella preparazione del periodo riproduttivo, con ripetuti colpi di becco oltre ad altri comportamenti aggressivi. Il becco degli psittaciformi ha una struttura particolare e la sutura craniofaciale è in grado di potenziare, grazie al gioco di leve, la forza disponibile creando un potente strumento atto a rompere gusci particolarmente duri per potersi cibare dei semi. La stessa struttura ovviamente diviene molto pericolosa quando il becco venga usato consciamente come arma di offesa.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante oltre all'indagine semiologica tipica nei confronti delle patologie osteoarticolari si siano affiancate nuove ed efficaci tecniche (Redig 1986; Harcourt-Brown, 2005; Gumpenberger & Scope, 2012) vi è la possibilità che queste comunque passino inosservati in sistemi dove l'individuo sia meno facilmente osservabile.

Nel primo caso il maschio di *T. aethiopicus* era parso zoppiare leggermente ma non in modo significativo ed alimentarsi e comportarsi in modo normale nella collezione, un ampio recinto con altre specie. Nel secondo, dopo l'attacco da parte del maschio, la femmina era stata tenuta a riposo solitaria e aveva mostrato stato prostrato ma non particolarmente negativo, se non un mese dopo velocemente peggiorare e morire per l'infezione sopra riportata.

In termini generali molta parte delle fratture può essere riparata con tecniche classiche o moderne (ad es. Redig 1986) ma necessita nelle collezioni di una precisa attenzione per l'individuazione dei comportamenti a rischio e di un training specifico per i keeper per l'individuazione dei sintomi e una gestione preventiva delle interazioni che sia basta su una adeguata conoscenza dei comportamenti dell'avifauna considerata.

BIBLIOGRAFIA

1. Gumpenberger M. and A. Scope (2012) Computed tomography of coxofemoral injury in five mute swans (*Cygnus olor*), *Avian Pathology*. 41, (5): 465-468.
2. Harcourt-Brown, N.H. (2005). Orthopaedic and beak surgery. In N.H. Harcourt-Brown & J. Chitty (Eds.). *Psittacine Birds*, 2nd edn., Ames, IA: BSAVA, Iowa State University Press (pp. 120-135).
3. Hart, B.L., (1988). Biological Basis of the Behavior of Sick Animals *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 12: 123-137.
4. Redig P. (1986). Clinical Review of Orthopaedic Techniques Used in the Rehabilitation of Raptors. In: Fowler ME (ed). *Zoo and Wild Animal Medicine*, 2nd Edn. Pub: Saunders. 1986, p 388 – 401.
5. Rothschild B.M. and R. Panza, (2005). Osteoarthritis is for the birds. *Clin Rheumatol.*, 25: 645–647
6. Tiemeier O.W., (1941). Repaired Bone Injuries in Birds. *The Auk* 58(3): 350-359.
7. Wood H.B., (1941). Fractures among Birds. *Bird-Banding*, 12 (2): 68-72.

ANDAMENTO DELLA CONTAMINAZIONE DA DEOSSINIVALENOLO (DON) E DA TOSSINA T-2 IN MANGIMI DESTINATO A SPECIE AVICOLE E DESCRIZIONE DI CASI CLINICI CORRELATI NEL POLLO DA CARNE

Tosi G.¹, Fiorentini L.¹, Ceroni S.², Casadio M.¹, Compagnoni E.³, Massi P.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sezione Diagnostica di Forlì - Via Marchini 1 - Forlì (FC) - forli@izsler.it

² Medico Veterinario Aziendale - Settore Avicolo - Via Linguerra 21, Imola (BO).

³ Laurea in Scienze farmaceutiche Applicate - Curriculum Tossicologia dell'Ambiente - Via Silvestro Lega 46, Modigliana (FC).

Summary

A 2-year survey was carried out in order to evaluate the incidence of mycotoxins in poultry feed. *Fusarium* mycotoxins tested were those known for their impact on feed industry and poultry husbandry, namely deoxynivalenol (DON) and T-2 toxin. A total of 235 feed samples were analyzed. The data obtained showed an increase in the levels of DON and T-2 toxin in 2013 and, in particular, in the summer-autumn period. In the same period some outbreaks linked to a trichotecen mycotoxicosis were observed in broiler chicken flocks. The toxic effects (clinical signs and lesions) of trichotecen observed in these cases are described.

INTRODUZIONE

Le micotossine rappresentano un serio pericolo per tutto il settore zootecnico. In campo avicolo i rischi più frequenti sono rappresentati dalla contaminazione da tricoteceni. Si tratta di un gruppo di micotossine comprendente circa 100 molecole prodotte prevalentemente da muffe appartenenti al genere *Fusarium* spp. Chimicamente i tricoteceni si dividono in macrociclici e non macrociclici. Le micotossine più importanti dal punto di vista tossicologico appartengono a quest'ultimo gruppo e si dividono, a loro volta, in non-macrocicliche di tipo A (comprendenti, tra le altre, la tossina T-2, la tossina H-T2 e il diacetossiscirpenolo o DAS) e in non macrocicliche di tipo B (tra cui il deossinivalenolo o DON e il nivalenolo). A livello cellulare i tricoteceni agiscono primariamente attraverso l'inibizione della sintesi proteica e, successivamente, inibendo la sintesi degli acidi nucleici. La loro azione tossica si manifesta pertanto sulle cellule in fase di attiva moltiplicazione (muose dell'apparato gastroenterico, cute, cellule linfoidi ed eritrociti). La principale risposta fisiologica all'intossicazione da tricoteceni è la minor assunzione di alimento. Da questo punto di vista il suino è più sensibile al DON, mentre le specie aviari sono più sensibili alla tossina T-2 e al DAS. I tricoteceni sono inoltre dotati di spiccata attività immunodepressiva, seconda soltanto alle aflatossine. Nella pratica clinica i casi di intossicazione da tricoteceni si rilevano con maggiore frequenza nell'allevamento della gallina ovaioia da consumo, probabilmente a causa degli elevati livelli di mais contenuti nella razione e della lunga durata del ciclo produttivo (e quindi dell'assunzione di alimento contaminato). Tuttavia, nel corso del 2013, sono stati osservati ripe-

tuti casi di intossicazione da tricoteceni anche nel pollo da carne. La descrizione di questi casi e i risultati delle prove di laboratorio condotte è il primo obiettivo di questo lavoro. Vengono inoltre illustrati e discussi i dati relativi ai livelli di contaminazione da tossina T-2 e da DON in mangimi destinati alle specie avicole esaminati, presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì, nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014.

MATERIALI E METODI

Casi clinici: i casi osservati si riferiscono al periodo Luglio-Agosto 2013. L'iter diagnostico prevedeva le seguenti fasi: esame clinico in allevamento, raccolta dei dati zootecnici, esame anatomo-patologico di soggetti con segni clinici, prove di laboratorio (parassitologiche, batteriologiche e virologiche mediante prove di biologia molecolare) ad ampio spettro per la conferma/esclusione di agenti infettivi, prove isto-patologiche condotte su sezioni di organo sede di lesioni macroscopiche sospette. Venivano inoltre esaminati (vedi paragrafo seguente) campioni di mangime prelevati in allevamento o in corrispondenza dello scarico dello stesso in azienda.

Ricerca di tossina T-2 e DON nei mangimi: sono stati raccolti i dati relativi alla ricerca di tossina T-2 e di DON in campioni di mangime conferiti presso la Sezione Diagnostica IZSLER di Forlì nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014. Sono stati considerati campionamenti di mangime completo prelevati direttamente in allevamento dal veterinario aziendale o dall'allevatore a seguito di un sospetto di micotossicosi oppure nell'ambito di periodici controlli aziendali. Sono stati inclusi nello studio i campioni provenienti dalle seguenti tipologie produttive: pollo da carne, gallina ovaioia da consumo (senza distinzione tra fase di accrescimento e fase di deposizione) e pollo riproduttore (senza distinzione tra linee leggere e pesanti e tra fase di accrescimento e fase di deposizione). I campioni sono stati raccolti direttamente in mangiatoia oppure al momento dello scarico del mangime in azienda. Non è stato adottato alcun protocollo standard di campionamento.

La ricerca di tossina T-2 e di DON è stata eseguita mediante l'impiego di test ELISA (TECNA®) che, in sintesi, prevedono le seguenti fasi: preparazione del campione (macinazione, miscelazione, estrazione in acqua/metanolo, filtrazione), esecuzione del test immunoenzimatico su micropiastra, lettura dei valori di assorbanza, calcolo della concentrazione della micotossina mediante l'impiego di curve di calibrazione. I limiti di rilevazione sono di 50 ppb (per il DON) e di 25 ppb (per la tossina T-2). I risultati sono stati raggruppati in categorie in funzione del livello di contaminazione.

RISULTATI

Ricerca di tossina T-2 e DON nei mangimi: Sono stati presi in esame 51 campioni esaminati nel 2012 (9 da polli da carne, 27 da galline ovaiole e 15 da riproduttori), 155 campioni del 2013 (58 da polli da carne, 66 da galline ovaiole, 31 da riproduttori) e 29 campioni esaminati nei primi due mesi del 2014 (3 da polli da carne e 26 da galline ovaiole). I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle 1 e 2:

Tabella 1: prevalenza della contaminazione da DON nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014.

| | 2012 (n=51) | 2013 (n=155) | 2014 (n=29) |
|--------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0-50 ppb | 43% | 20% | 17% |
| 51-250 ppb | 47% | 31% | 48% |
| 251-500 ppb | 10% | 26% | 25% |
| 501-1000 ppb | 0% | 16% | 10% |
| >1000 ppb | 0% | 7% | 0% |

n= numero di campioni esaminati

Tabella 2: prevalenza della contaminazione da tossina T-2 nel periodo gennaio 2012-febbraio 2014.

| | 2012 (n=51) | 2013 (n=155) | 2014 (n=29) |
|------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0-25 ppb | 88% | 48% | 34% |
| 26-50 ppb | 12% | 34% | 48% |
| 51-100 ppb | 0% | 16% | 18% |
| >100 | 0% | 2% | 0% |

n= numero di campioni esaminati

Dai dati raccolti emerge un significativo aumento dei livelli di contaminazione di entrambe le micotossine nel corso del 2013 associato ad un sensibile incremento del numero dei campioni esaminati (e, di conseguenza, dei casi sospetti). Tale incremento veniva rilevato soprattutto a partire dal terzo trimestre dell'anno e si manteneva, sia pure in maniera meno evidente, fino alla fine del 2013 e all'inizio del 2014. Questo andamento si osservava soprattutto nei mangimi prelevati da gruppi di polli da carne e di galline ovaiole da consumo (tabelle 3 e 4):

Tabella 3: prevalenza della contaminazione da DON nel 2013 in funzione del tipo di allevamento.

| | Polli da carne | Galline ovaiole | Riproduttori |
|--------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| 0-50 ppb | 8% | 29% | 28% |
| 51-250 ppb | 25% | 31% | 48% |
| 251-500 ppb | 30% | 21% | 24% |
| 501-1000 ppb | 23% | 17% | 0% |
| >1000 ppb | 14% | 2% | 0% |

Tabella 4: prevalenza della contaminazione da tossina T-2 nel 2013 in funzione del tipo di allevamento.

| | Polli da carne | Galline ovaiole | Riproduttori |
|------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| 0-25 ppb | 36% | 47% | 71% |
| 26-50 ppb | 43% | 35% | 16% |
| 51-100 ppb | 16% | 18% | 13% |
| >100 ppb | 5% | 0% | 0% |

Casi clinici nel pollo da carne: a partire dai mesi di luglio-agosto 2013 venivano osservati diversi casi clinici da sospetta intossicazione da tricoteceni in gruppi di polli da carne. Dal punto di vista clinico/zootecnico i gruppi colpiti presentavano anoressia/disoressia, difformità di sviluppo, riduzione degli indici di crescita, scarso sviluppo del piumaggio, deficit di pigmentazione di cute e tarsi. I soggetti colpiti in modo più grave presentavano inoltre una profonda depressione del sensorio associata a difficoltà posturali e tremori. Si osservava un incremento degli indici di mortalità collegabili solo in parte a complicazioni batteriche secondarie (clostridiosi, colisetticemia). Il quadro clinico cominciava e rendersi evidente attorno ai 20 giorni di vita e si manteneva pressoché costante per tutta la durata del ciclo produttivo. All'esame anatomico-patologico si rilevavano le seguenti lesioni macroscopiche: necrosi e ulcere nella cavità orale (in particolare nella regione del palato), contenuto gastroenterico scarso o del tutto assente con erosioni e ulcere a carico della membrana (e della mucosa sottostante) dello stomaco muscolare associate talvolta alla presenza di melena; ipoplasia degli organi linfoidi (timo, borsa di Fabrizio, milza), lesioni infiammatorie-congestive a carico di tutta la mucosa del duodeno e dell'ileo, intensa congestione del pancreas, aree di necrosi epatiche. All'esame isto-patologico si evidenziavano le seguenti lesioni: estese necrosi coagulative al fegato con focolai di infiltrazione linfoide sub-endoteliale, necrosi multifocali a carico della polpa bianca splenica, gastrite eterofila, necrosi dei follicoli linfatici intestinali. Le prove di laboratorio escludevano il coinvolgimento di agenti infettivi di natura batterica o virale. Nelle fasi successive del ciclo produttivo venivano diagnosticati casi di enterite necrotica e di colisetticemia. I livelli di DON rilevati nel mangime al momento della comparsa del quadro clinico erano compresi tra 590 ppb e 3240 ppb, mentre i livelli di tossina T-2 oscillavano tra 36 e 158 ppb. I principali dati produttivi (confrontati con quelli del ciclo precedente) di tre casi tra quelli osservati sono riassunti nella tabella 5:

Tabella 5: principali dati produttivi di tre gruppi “problema” confrontati con le performance del ciclo precedente.

| | Gruppo “A” | | Gruppo “B” | | Gruppo “C” | |
|-----------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|
| | Ciclo normale | Ciclo “micotossine” | Ciclo normale | Ciclo “micotossine” | Ciclo normale | Ciclo “micotossine” |
| Mortalità | 2,96% | 11,65% | 3,95% | 5,68% | 2,32% | 4,69% |
| Kg /m ² | 43,92 | 38,26 | 43,61 | 42,08 | 48,86 | 39,91 |
| Indice di conversione | 1,75 | 1,87 | 1,73 | 1,91 | 1,69 | 1,87 |
| Indice di performance | 308,4 | 260,4 | 334,2 | 253,9 | 346,7 | 271,2 |

DISCUSSIONE

Il quadro clinico e le lesioni osservate nei casi riportati in questo lavoro sono compatibili con un’intossicazione da tricoteceni. Prove sperimentali pubblicate in letteratura hanno dimostrato come livelli di 4 ppm di tossina T-2 somministrati per 3 settimane in pulcini di 1 giorno provocano riduzioni significative degli indici di crescita, segni clinici di tipo neurologico, lesioni necrotiche al fegato e agli organi linfoidi, alterazioni del piumaggio. Le lesioni necrotico-ulcerative al cavo orale sono state riprodotte sperimentalmente impiegando diversi dosaggi/tempi di esposizione di tossina T-2 (4 ppm per 1 settimana, 400 ppb per 7 settimane, 100 ppb per 5 settimane). Il rifiuto dell’alimento è stato invece riprodotto sperimentalmente con dosi di tossina T-2 di 0,3 ppm (nell’acqua di bevanda) e di 5 ppm nell’alimento. Sempre secondo i dati sperimentali pubblicati in letteratura, l’azione tossica del DON nelle specie aviari si manifesterebbe soprattutto sulla funzionalità dell’apparato digerente (attraverso la riduzione della lunghezza e dello spessore dei villi intestinali) e sul sistema immunitario. Anche in questo caso i livelli di DON grazie ai quali sono stati riprodotti sperimentalmente i suoi effetti tossici (ad esempio 16 ppm per 3 settimane) sono superiori a quelli rilevati nei casi descritti in questo lavoro. Va tuttavia ricordato che, nella maggior parte dei casi, le prove sperimentali utilizzano diete artificialmente contaminate da singole micotossine purificate, una situazione ben diversa da quelle di campo in cui è frequente la contemporanea presenza di più micotossine che possono interagire tra loro con effetti additivi o addirittura sinergici.

Il significativo rialzo dei livelli di tossina T-2 e di DON rilevato nel 2013 (soprattutto nei mesi estivi) è probabilmente collegato all’impiego di lotti di materie prime contaminate. Non è stato possibile, tuttavia, approfondire le ricerche su queste ultime né conoscerne la provenienza. I tricoteceni possono contaminare la maggior parte dei cereali e molto dipende dalle condizioni climatiche in cui questi ultimi vengono coltivati e raccolti. W

CONCLUSIONI

Se l’approccio al problema “micotossine” è prettamente di tipo sanitario, gli strumenti diagnostici disponibili (osservazione dei segni clinici e delle lesioni, valutazione dei dati produttivi, esclusione di altre patologie) possono essere sufficienti a formulare una diagnosi corretta. Il regolare controllo dei livelli di micotossine nelle materie prime e nei mangimi può essere utile a confermare il sospetto diagnostico e, più in generale, a evidenziare tempestivamente pericolosi scostamenti dai livelli abituali di contaminazione. In questo tipo di approccio possono assumere una valenza significativa anche livelli di contaminazione distanti da quelli riportati dalle prove sperimentali pubblicate in letteratura e dai (peraltro scarsi) limiti di legge. Tutto questo viene invece vanificato se l’approccio al problema è esclusivamente di tipo commerciale.

BIBLIOGRAFIA

1. Awad W.A., Ghareeb K., Bohm J. (2012). The toxicity of Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in poultry feeding. *World’s Poultry Science Journal* 68:651-667.
2. Chi M.S., Mirocha C.J., Kurtz H.J., Weaver G., Bates F., Shimoda W. (1977). Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Science* 56:306-313.
3. Girgis G.N., Smith T.K. (2010). Comparative aspects of Fusarium mycotoxins in poultry fed diets containing naturally contaminated grains. *World’s Poultry Science Journal* 66:65-86.
4. Kubena L.F., Huff W.E., Harvey R.B., Phillips T.D., Rottinghaus G.E. (1989). Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in boiler chicks. *Poultry Science* 68:622-626.
5. Sklan D., Klipper E., Friedman A., Shelly M., Makovsky B. (2001). The effect of chronic feeding of diacetoxyscirpenol, T-2 toxin and aflatoxin on performance, health and antibody production in chicks. *Journal of Applied Poultry Research* 10:79-85.
6. Wyatt R.D., Colwell W.M., Hamilton P.B., Burmeister H.R. (1973). Neural disturbances in chickens caused by dietary T-2 toxin. *Applied Microbiology* 26:757-761.
7. Wyatt R.D., Hamilton P.B., Burmeister H.R. (1973). The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Science* 52:1853-1859.