FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:

LE INFEZIONI DA "ESCHERICHIA COLI" DEGLI ANIMALI

BRESCIA - 16 GIUGNO 1983

10

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:
LE INFEZIONI DA
«ESCHERICHIA COLI»
DEGLI ANIMALI

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1979 - Infezioni Respiratorie del Bovino

1980 - L'oggi e il domani della Sulfamidoterapia Veterinaria

1980 - Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria

1980 - Gli antibiotici nella pratica veterinaria

1981 - La Leucosi Bovina Enzootica

1981 - La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia

1982 - Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale

1982 - Le Elmintiasi nell'allevamento intensivo del Bovino

1983 - Zoonosi ed animali da compagnia

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA
Brescia - Via Bianchi, 7

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:

LE INFEZIONI DA "ESCHERICHIA COLI" DEGLI ANIMALI

BRESCIA: 16 Giugno 1983

Edito a cura della
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - gennaio '84

Stampa: La Nuova Cartografica - Brescia

INDICE

G.F. PANINA: Presentazione . . . . . pag. 9

PARTE PRIMA

D. GALASSI: Le Infezioni da *E. coli* degli animali. Introduzione al tema . . . . . » 13

P.A.M. GUINÉE e W.H. JANSEN: Tipizzazione sierologica dei ceppi enteropatogeni di *E. coli* . . . . . » 19

A. NIGRELLI, G. CONEDERA, F. MELIOTA e M. ZAVANELLA: Rilievi epidemiologici sulle infezioni da *E. coli* negli animali domestici in Italia . . . . . » 33

R.G. HESS, P.A. BACHMANN e G. BALJER: Significato dell'infezione da *rotavirus* nella diarrea dei vitelli neonati indotta da *E. coli* enterotossici . . . . . » 53

Discussione parte prima . . . . . » 69

PARTE SECONDA

P.J. DAVIS, J.W. CHIDLOW, W.D. ALLEN, J.A. BLADES, M.A. LINGGOOD e P. PORTER: Immunoprofilassi delle infezioni da *E. coli* nei suinetti mediante vaccini somministrati con l'alimento . . . . . » 85

G. BALJER, W. EICHHORN e P.A. BACHMANN: Immunoprofilassi delle infezioni da *E. coli* nei vitelli . . . . . » 109

Discussione parte seconda . . . . . » 128

D. GALASSI: Conclusioni del moderatore . . . . . » 135

MODERATORE

D. GALASSI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise - Teramo.

RELATORI

G. BALJER
Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenmedizin - München - Deutschland.

G. CONEDERA
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Padova.

P.A.M. GUINÉE
Rijks Instituut voor de Volksgezondheid - Bilthoven - Nederland.

G. HESS
Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenmedizin - München - Deutschland.

A. NIGRELLI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Brescia.

P. PORTER
Unilever Research - Sharnbrook, Bedford - England.

Ringraziamento

I testi italiani delle relazioni e degli interventi in lingua straniera sono stati curati da M. Amadori, F. Meliota, A. Nigrelli e S. Tagliabue dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. L'editore ringrazia.

PRESENTAZIONE

A meno di un mese da una precedente simile manifestazione, Direzione, Docenti ed Allievi della Scuola per la Ricerca Scientifica si ritrovano oggi in quest'aula, piacevolmente, con molti Colleghi ed amici, italiani e stranieri, per una di quelle occasioni di cultura che puntualmente, ormai possiamo dire, i programmi della nostra Scuola vanno proponendo a Veterinari, a Medici, a Biologi, a tutti coloro a cui stanno a cuore le complesse problematiche relative alla salute dell'uomo e degli animali.

Sono iniziative prese nell'ambito del «Corso Annuale di Perfezionamento in Zooprofilassi» che la nostra Scuola svolge ormai da 7 anni, qui a Brescia, con il sostegno dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Enti che hanno aggiunto alle loro benemerenze quella di aver colto la preoccupazione affiorante nel nostro Paese per la qualità del personale addetto ai laboratori ed ai servizi veterinari, cimentandosi in un impegno oneroso, che prevede la preparazione seria del ricercatore scientifico veterinario.

Sono molti ormai i giovani Laureati che usufruendo di borse di studio sono passati da questa Scuola, dove hanno vissuto un intero anno di lavoro intenso, impegnativo, a tempo pieno. Abbiamo la presunzione di credere che trovata la giusta collocazione, essi saranno in grado di creare un futuro nuovo per la veterinaria italiana.

L'argomento prescelto per la Giornata di Studio odierna riguarda «*Le infezioni da E. coli degli animali*».

Ci è stato suggerito da più parti, ma dobbiamo dire che siamo stati riluttanti ad accettarlo. Se n'è parlato tanto, in tante occasioni. Riproporlo 100 anni dopo che Escherich ha descritto il suo *Coli*, 50-60 anni dopo che si è incominciato a parlare di colibacillosi dell'uomo e degli animali poteva sembrare banale. Lo abbiamo fatto, tuttavia, perché è vero che ancora oggi è difficile trarre delle conclusioni convincenti su particolari aspetti di questa patologia, anche se molto è stato fatto nella classificazione delle varie forme enteriche da *E. coli*,

nella tipizzazione dei ceppi batterici basata sull'identificazione di particolari antigeni, nell'identificazione di cause condizionanti, nella profilassi.

Di questo soprattutto ci parleranno i relatori di oggi, esperti in materia, di diversa nazionalità ed estrazione, a cui siamo grati per aver accettato il nostro invito e per il contributo che essi certamente daranno al nostro aggiornamento professionale.

Ringrazio anche il collega ed amico Galassi; mi è stato consigliere nella stesura del programma e modererà il dibattito odierno.

Un grazie anticipato a tutti i partecipanti per il contributo che mi auguro vorranno fornire in fase di discussione.

G.F. Panina
Direttore
Scuola per la Ricerca Scientifica

PARTE PRIMA

D. GALASSI *

LE INFEZIONI DA E. COLI DEGLI ANIMALI

Introduzione al tema

La Giornata di studio su le «INFEZIONI DA *Escherichia coli* DEGLI ANIMALI» giunge in un momento propizio: le principali organizzazioni scientifiche veterinarie — tra cui l'Associazione Mondiale dei Microbiologi, Immunologi ed Infettivologi Veterinari — dibattono oggi in tutto il mondo il problema delle enteriti neonatali ed in particolare quello delle sindromi enteriche negli allevamenti intensivi di bovini e suini. Ne fanno fede il programma del Congresso WAVMI di Barcellona (Spagna) dell'ottobre scorso e quello di Perth (Australia) del prossimo agosto.

La Scuola per la Ricerca Scientifica di Brescia, attraverso la sensibilità dei suoi Dirigenti, ha voluto dare, puntuale, un contributo all'aggiornamento della classe veterinaria italiana. Sono sicuro che i Ricercatori ed i Docenti qui riuniti, attraverso le loro relazioni e con la discussione delle stesse, forniranno risposte adeguate ad alcuni degli interrogativi che i Pratici ancora oggi si pongono nel campo delle colibacillosi.

Escherichia coli viene spesso considerato come agente d'infezione che deve essere studiato e combattuto con i metodi usati per le malattie infettive classiche. Eppure da oltre sessant'anni Smith e Lowell (1922) hanno notato che le colibacillosi neonatali dei vitelli sono strettamente legate all'irregolare assunzione di colostro. Questo fattore e

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise - Teramo.

molti altri — che negli ultimi lustri sono stati indicati come «condizionanti» — fanno oggi classificare la gran parte dei ceppi di *E. coli* come potenzialmente patogeni, cioè agenti opportunisti.

D'altra parte sono ormai numerosi i ceppi di *E. coli* che, identificati in focolai di sindromi trasmissibili e considerati patogeni in base a varie prove di laboratorio, non possono essere ritenuti in rapporto eziologico con l'infezione, secondo i postulati di Koch. È stato poi dimostrato che la presenza di fattori di aderenza come K88, K99 ed altri, non è sufficiente per determinare la patogenicità di un germe. Questo carattere è legato anche alla produzione di tossina ed agli antigeni somatici (Cavirani, 1983).

Di qui l'associazione pressoché costante, nei ceppi enterotossici, di antigeni di aderenza (K) con determinati antigeni somatici (O) e produzione di enterotossine (ST nei ceppi patogeni per vitelli e agnelli, ST e LT nei ceppi patogeni per suini).

Le indagini epidemiologiche hanno poi evidenziato che ogni specie animale è caratterizzata da infezioni ricorrenti di *E. coli* provvisti di determinati antigeni K (Ørskov, 1980).

Nell'ambito delle stesse specie animali, alcune combinazioni O/K prevalgono sulle altre: ciò dimostrerebbe la complementarietà patogenetica degli antigeni capsulari con quelli somatici.

Il quadro patogenetico è poi complicato da altre osservazioni.

— *E. coli* di origine suina in grado di generare focolai di gastro-enteriti trasmissibili, positivi alla prova di microemoagglutinazione mannito-resistente, sono privi di antigeni K88 e K99. Questo rilievo farebbe pensare all'esistenza di un fattore di colonizzazione emoagglutinante non ancora identificato (Oliveira e coll. 1981).
— I ricettori cellulari dei villi intestinali, specifici per il K88, sono codificati da un fattore mendeliano con il carattere di aderenza (S) dominante rispetto a quello di non-aderenza (s). Gli omozigoti dominanti (SS) e gli eterozigoti (Ss) possiedono i ricettori, mentre questi sono assenti negli omozigoti recessivi (ss). Tale fatto consente di affermare che i suinetti nati da progenitori recessivi, manifestano una resistenza spiccata nei confronti di *E. coli* K88+ (Sellwood, 1979).

— Il pH dell'intestino tenue ha valori di 6,5-7; a questi valori gli antigeni K88 e K99 dimostrano una forte carica elettropositiva, in grado di essere attratta dalle cariche elettronegative dei mucopolisaccaridi costituenti la mucina che riveste l'epitelio intestinale (Girardeau e coll. 1980).

— In seguito a stress sarebbe rallentata la peristalsi intestinale ed inibita la motilità ciliare: ciò favorirebbe l'intensa colonizzazione in ambito intestinale di *E. coli* che possiedono i fattori di adesione. Poiché la «sensibilità allo stress» è nel suino un fattore genetico, verosimilmente di tipo autosomico e recessivo (Galassi, 1983), può essere ipotizzato che suinetti omozigoti, nati da progenitori non sensibili allo stress, risultino resistenti anche nei confronti di *E. coli* K88.

Dal punto di vista clinico, possiamo distinguere nei suini, nei vitelli e negli agnelli, alcune sindromi in cui viene con notevole frequenza identificato *E. coli*:

1) *L'enterite neonatale* compare nei primi 4-5 giorni di vita in soggetti nati in allevamenti intensivi. Gli animali sembrano normali nelle prime 12 ore, successivamente si manifesta una diarrea acquosa profusa — con feci giallastre o biancastre — che frequentemente induce disidratazione mortale nel giro di 18-72 ore.

Viene colpita la maggior parte dei neonati e l'indice di mortalità può raggiungere delle punte elevate.

E. coli enterotossici (ETEC), agenti di questa sindrome, colonizzano nella parte anteriore dell'intestino tenue mediante adesine legate alle strutture antigeniche K, hanno forte potere invasivo ed esplicano marcata attività tossica.

In molti casi possono essere associati ad *E. coli* dei *Rotavirus* e dei *Coronavirus*, mentre sono rilevabili, come fattori condizionanti, insufficiente assunzione di colostro, errori manageriali, microclima non idoneo nelle sale-parto, stress dovuti a raffreddamento e a superaffollamento.

2) *La diarrea post-svezzamento* si verifica alcuni giorni dopo lo svezzamento o dopo la brusca sospensione del colostro, quando la dieta è modificata rapidamente e gli animali sono sottoposti ad altri fat-

tori stressanti quali il trasporto e l'ammassamento. In tale evenienza viene favorita la colonizzazione di ETEC nella porzione anteriore del piccolo intestino. I soggetti colpiti presentano diarrea, abbattimento, anoressia e rialzo termico che può permanere 2-3 giorni. Gli animali più sviluppati manifestano talvolta collasso e possono venire a morte dopo un breve periodo di diarrea; tuttavia la mortalità totale da diarrea post-svezzamento è molto più bassa di quella dovuta ad enterite neonatale. In questo caso le tossine elaborate dagli ETEC esplicano la loro attività quasi esclusivamente in ambito intestinale.

3) *La sindrome setticemica da E. coli* generalmente fa seguito alla sospensione della somministrazione del colostro o ad una assunzione irregolare dello stesso. Essa è preceduta o accompagnata da diarrea, gli animali sono deboli e assonnati e rapidamente muoiono. Alcuni soggetti possono sopravvivere a lungo manifestando broncopolmonite, poliartrite e meningite: quest'ultima è frequentemente fatale.

4) *La malattia degli edemi* è una sindrome specifica del suino, diffusa in tutte le parti del mondo dove viene effettuato l'allevamento intensivo. La malattia è legata a quattro particolari circostanze: a. *l'età* che corrisponde normalmente a quella dello svezzamento, sebbene in alcuni casi possano essere colpiti soggetti di diversa età; b. *il cambiamento di alimentazione* dovuto sia al cambiamento dell'alimento che alla variazione delle modalità di somministrazione; c. *il rapido accrescimento*: la malattia è reperita più frequentemente negli animali più sviluppati; d. *la diarrea*, moderata, che insorge uno o due giorni prima delle manifestazioni cliniche caratteristiche. Queste compaiono improvvisamente, hanno decorso rapido e terminano generalmente con la morte dell'animale.

I suini colpiti manifestano andatura barcollante, talvolta atassia, tremori e spasmi. Il grugnito è roco e può essere presente edema delle palpebre e della faccia. La temperatura è generalmente normale o subnormale e gli animali sono spesso costipati, anche se in alcuni casi si può manifestare diarrea che riflette la produzione di enterotossine da parte di *E. coli*. In realtà nella malattia degli edemi i fattori di patogenicità sembrano molto complessi e legati alle adesine e a varie sostanze tossiche (endotossine, vasotossine, neurotossine). Le tossine agiscono sia direttamente sia indirettamente — attraverso una reazione di tipo allergico in animali precedentemente sensibilizzati — sia

con entrambi i meccanismi, diretti e indiretti (Nigrelli e Zavanella, 1983).

Negli animali colpiti da malattia degli edemi sono stati talvolta rinvenuti altri batteri come *Shigellae* e *Salmonellae*, mentre in molte occasioni sono stati identificati anche *Coronavirus-like*. Gli esami istopatologici dimostrano alterazioni particolarmente gravi nelle arteriole, nell'endocardio, nella mucosa intestinale, nei linfonodi, nella corteccia cerebrale. Molte di queste lesioni sono riferite a fenomeni di tipo allergico, indotti dalle stesse endotossine, come sopra ricordato.

La profilassi delle sindromi colibacillari sarà ampiamente trattata dai Relatori. Devo però far notare che oltre alla profilassi immunitaria specifica, in questi ultimi anni sono state tentate nuove vie per la prevenzione delle infezioni condizionate (Mayr, 1982, Galassi e coll., 1980); esse sfruttano i meccanismi di resistenza non-specifica che, per la massima parte, sono mediati da cellule immuno-competenti. I risultati, anche in campo pratico, sembrano soddisfacenti.

La terapia delle sindromi diffusive dei giovani animali, in cui è evidenziato *E. coli* risulta sempre problematica. Antibiotici e chemioterapici, per varie ragioni, non sono in grado di costituire una barriera solida e duratura. Negli allevamenti intensivi la somministrazione di colostro, siero o globuline, incontra spesso ostacoli, sia economici che organizzativi. C'è però una nuova via che, in futuro, potrebbe risultare vantaggiosa: l'impianto o la selezione di una flora microbica intestinale in grado di contrastare validamente lo sviluppo di microrganismi patogeni.

Queste note — cha richiamano sinteticamente problemi eziologici, patogenetici, profilattici e terapeutici non completamente risolti — vogliono suggerire all'uditorio spunti per la discussione. Ho ritenuto superfluo schematizzare delle sindromi morbose che tutti conosciamo, perché non è opportuno sacrificare le relazioni e la discussione, che mi auguro vivace e proficua.

BIBLIOGRAFIA

1) CAVIRANI S. (1983): Gli antigeni K dell'*Escherichia coli*. Selez. Vet., *24*, 763-776.
2) GALASSI D. (1983): Le sindromi condizionate nell'allevamento intensivo del suini. Selez. Vet., *24*, 547-567.
3) GALASSI D., PELLICCIONI A., GALASSI P., AMADORI M., URBANI G., SEMPRINI P. (1983): Interferon inducers for the prophylaxis of conditioned infections in piglets. Proceed. Symp. on Adjuvants and non-specific Immunity - Venice 27-28 aprile 1983 (in stampa).
4) GALASSI D., PELLICCIONI A., MONALDI M.V. (1980): Controllo delle infezioni condizionate dei vitelli mediante induttori di paraimmunità. Nuovo Progresso Vet., *35*, 1179-1185.
5) GIRARDEU J.P., DUBOURGUIER M.C., CONTREPOIS M. (1980): Attachement des *E. coli* enteropathogènes a la muquese intestinale. G.T.V., 80-4-B-190, 49-60.
6) GYLES C.L. (1971): Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *Escherichia coli* strains enteropathogenic for pigs. Ann N.Y. Acad. Sci. *176*, 314-322.
7) KAECKENBEECK A., SCHOENAERS P., PASTORET P., JOSSE M. (1977): Absence d'enterotoxine thermolable chez les *Escherichia coli* enteropathogènes isolés du veau. Ann. Méd. Vét. *121*, 55-57.
8) MAYR A. (1982): Paramunität und Paramunisierung - Zbl. Vet. Med., *29 B*, 5-23.
9) NIGRELLI D., ZAVANELLA M. (1983): Le infezioni sostenute da *Escherichia coli* nel suinetto prima e dopo lo svezzamento. Selez. Vet. *42*, 383-411.
10) OLIVEIRA M., PESTANA DE CASTRO A., SERAFIM M., GIORGI W. (1981): Mannoseresistant haemagglutination and colonization factors among *E. coli* strains isolated from pigs. Vet. Rec. *109*, 275-278.
11) ØRSKOV F., ØRSKOV J. (1980): Special *Escherichia coli* serotypes from enteropathies in domestic animals and man. Zbl. Vet. Med. *29 B*, 7-14.
12) SELLWOOD R. (1979): *Escherichia coli* diarrhea in pigs with or without the K88 receptor. Vet. Rec. *105*, 228-230.
13) SMITH T., LITTLE R.B. (1922): The significance of colostrum to the newborn calf. J. Exper. Med. *36*, 181-198.

P.A.M. GUINÉE e W.H. JANSEN *

TIPIZZAZIONE SIEROLOGICA DEI CEPPI ENTEROPATOGENI DI E. COLI

1. *Introduzione*

La malattia enterica causata da *Escherichia coli* nell'uomo e negli animali può manifestarsi in diverse forme (14).

a. La Malattia degli Edemi è un esempio della *forma enterotossiemica,* finora riscontrata solo nei suini.
b. La colisetticemia nei vitelli neonati è un esempio della *forma setticemica.*
c. La *forma invasiva* è stata riscontrata fino ad ora solamente come una malattia intestinale nell'uomo, ed è molto simile alla shigellosi.
d. La diarrea neonatale dei suinetti e dei vitelli sono esempi della *forma enterotossica.*

Questo lavoro è limitato alla forma enterotossica negli animali.

2. *Patogenesi della diarrea neonatale da enterotossine di E. coli*

L'infezione da *E. coli* avviene per via orale. I batteri attraversano facilmente lo stomaco poiché il suo pH è ancora intorno alla neutralità nel suinetto neonato e raggiungono il piccolo intestino. I ceppi enterotossici di *E. coli* resistono alla peristalsi del piccolo intestino e colonizzano poiché possono aderire alla parete del piccolo intestino mediante fattori di adesione. In tal modo la/le enterotossine sono prodotte molto vicino ai loro siti recettori nella mucosa intestinale. Esse inducono la secrezione di acqua ed elettroliti nel lume, provocando diarrea, disidratazione e morte.

* Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven - Nederland.

La localizzazione dell'*E. coli* nel piccolo intestino dipende dal tipo di adesina e dall'animale ospite. I ceppi che possiedono l'adesina K88 aderiscono principalmente al tratto anteriore del piccolo intestino dei suinetti. I ceppi che posseggono il fattore d'adesione P987 colonizzano nel tratto posteriore del piccolo intestino nei suinetti. I ceppi che posseggono l'adesina K99 aderiscono ai tratti medio e posteriore del piccolo intestino in vitelli e suinetti (25).

3. *Adesine*

Le proprietà adesive di *E. coli* sono associate con antigeni di superficie della cellula batterica. Il termine «adesine» è stato usato per descrivere sostanze che mediano l'adesione dei microorganismi a una superficie (4). Le adesine associate a ceppi di *E. coli* isolati da suini con diarrea sono K88 e P987 (17,27). Il fattore d'adesione K99 può anche essere evidenziato su ceppi di *E. coli* isolati da suini con diarrea (15) ma si riscontra più frequentemente sulla superficie di ceppi di *E. coli* associati a diarrea nei vitelli. Queste adesine hanno proprietà antigene e sono quindi spesso considerate antigeni. L'antigene K88 si presenta in almeno 3 distinte varietà sierologiche K88ab, K88ac (20) e K88ad (9) ognuna delle quali è anche sierologicamente distinta dai fattori di adesione K99 e P987. Questi antigeni sono codificati da plasmidi e di solito possono essere trasferiti ad idonei ceppi riceventi per coniugazione. Queste adesine non sono mai presenti in combinazione su un ceppo. Recentemente sono state riscontrate strutture di superficie con proprietà adesive su ceppi che possiedono anche l'antigene K99 come F41 (16), Fy e F92B (2) e Att25 (22). In genere si può dire che le adesine hanno una struttura fibrillare o filamentosa. Anche le fimbrie di tipo 1 hanno proprietà adesive ma sembra esistere una notevole differenza tra queste strutture e le adesine descritte. L'attacco a diversi tipi di cellule mediato dalle adesine K88, K99 e P987 non è inibito da D-Mannosio, mentre la capacità adesiva delle fimbrie di tipo 1 di molti ceppi di *E. coli* esaminati è specificamente inibita da questo zucchero. Anche la formazione di pellicola in brodocoltura statica è associata con la produzione sia di fimbrie di tipo 1 che di adesina P987. Tuttavia la formazione di pellicola è inibita quando D-Mannosio è aggiunto al terreno di microorganismi che producono

fimbrie di tipo 1 (18). Ciò non accade quando ceppi di *E. coli* P987 sono trattati nello stesso modo. Comunque, l'adesione mannosio-sensibile mediata dalle fimbrie di tipo 1 sembra non avere alcuna importanza riguardo all'enteropatogenicità dei ceppi di *E. coli*. Per dettagli ulteriori si rimanda il lettore a Gaastra e de Graaf (6).

Nella ricerca della presenza di adesine è importante considerare le condizioni di coltura dei microorganismi. Ogni adesina richiede diversi principi nutritivi o condizioni di crescita per la sua espressione:

1. L'antigene *K88* è facilmente sintetizzato su terreni nutritivi disponibili in commercio come agar nutritivo o agar sangue.
2. L'antigene *K99* è molto esigente nei suoi fabbisogni ed è prodotto in modo ottimale su terreni minimi arricchiti con IsoVitalex (terreno Minca-Is) (7,8). Si è visto che la biosintesi di K99 viene inibita dalla presenza di alanina (3).
3. L'adesina *P987* dovrebbe essere coltivata in brodocoltura statica perché si abbia la produzione della pellicola (13).

Gli antigeni P987, K88 e K99 sono espressi solo quando i ceppi sono coltivati intorno a 37°C. Quando questi sono coltivati a una temperatura di 20°C o meno, non viene sintetizzato alcun antigene K88 o K99.

4. *Enterotossine*

Nei ceppi di *E. coli* venivano distinti originariamente 2 tipi di enterotossina (24):

a. LT (tossina labile): è inattivata dal calore a 60°C, ha un alto peso molecolare ($>$ 100.000), è immunogena, consta di 2 subunità e reagisce crociatamente con l'enterotossina del *V. cholerae*.
b. ST (tossina stabile): non è inattivata dal calore a 100°C per 15 minuti, ha un basso peso molecolare ($<$ 20.000) e non è immunogena.

Entrambe le enterotossine sono codificate da plasmidi (23).

La ST è stata poi suddivisa in 2 gruppi con modelli di risposta leggermente diversi nelle varie prove per ST (1,12,19).

L'approccio più diretto nella diagnosi della forma enterotossica della malattia consisterebbe nell'identificazione dell'enterotossina. Sebbene progressi importanti siano stati fatti nel saggio in vitro di LT, la

ricerca dell'enterotossina nel Centro Diagnostico Veterinario (D.V.) non è ancora facilmente applicabile. In genere si può dire che c'è correlazione positiva tra enterotossicità e certe caratteristiche antigene in *E. coli*. Quindi la sierotipizzazione è il metodo diagnostico preferibile per l'evidenziazione dei ceppi enterotossici di *E. coli* nel Centro D.V. Come sarà descritto successivamente, la metodologia è relativamente semplice e veloce.

5. *Proprietà antigene (sierologiche) di E. coli*

I singoli ceppi isolati di *E. coli* possiedono diversi determinanti antigeni. Tre antigeni di superficie sono correntemente usati a scopi diagnostici: antigeni O, H e K.

a. *L'antigene O* è il polisaccaride specifico del lipopolisaccaride della parete cellulare. È termostabile, vale a dire il riscaldamento a 100°C per 2 ore non altera la sua specificità sierologica. Fino ad ora, sono stati identificati e classificati 167 diversi antigeni O (denominati O1-O167) (la classificazione di nuovi antigeni di *E. coli* (O, H o K) è coordinata dal *World Health Organization Collaborative Centre for Reference and Research on Escherichia coli* di Copenhagen, da Ida e Frits Ørskov).

   Gli antisieri O monospecifici possono essere preparati immunizzando conigli con batteri uccisi col calore.

   Si dovrebbe puntualizzare che, a causa della enorme varietà antigene di *E. coli*, la preparazione e particolarmente il controllo della specificità dei sieri anti-*E. coli* è un compito di laboratori specializzati. Si rimanda il lettore ai manuali standard sull'argomento di Edwards e Ewing (5) e Sojka (21).

b. Molti ceppi di *E. coli* sono mobili per la presenza di flagelli. I flagelli posseggono un cosìdetto antigene flagellare o *antigene H*. Esso è costituito di proteine ed è termolabile. Sono stati classificati cinquantacinque antigeni H (H1-H55).

   Gli antisieri H possono essere preparati immunizzando conigli con sospensioni di batteri a elevato grado di mobilità, inattivate con formalina. Può essere necessario rimuovere gli anticorpi O dall'an-

tisiero H mediante adsorbimento con cellule del ceppo di *E. coli* omologo uccise col calore.

c. Molte colture di *E. coli* possiedono un antigene capsulare o *antigene K*. Quando negli ultimi quarant'anni fu sviluppata la sierologia di *E. coli*, Kauffmann usava la non-agglutinabilità O come criterio per stabilire la presenza di un antigene K. I ceppi vitali che non reagivano con l'antisiero O monospecifico omologo venivano considerati dotati di un antigene K. In tal modo, sono stati classificati 103 antigeni K (K1-K103). Tutti gli antigeni K sono inattivati per riscaldamento a 100°C per 2 ore, eccetto quelli cosìdetti di tipo A, che sono inattivati solamente con riscaldamento a 121°C per 2 ore. Recenti studi di Ørskov e coll. (21) hanno dimostrato che solo una parte degli antigeni K già classificati è di natura polisaccaridica. Essi hanno proposto di tralasciare gli antigeni K non polisaccaridici dallo schema diagnostico, a eccezione di antigeni fibrillari come K88 e K99. Dei 103 antigeni K classificati inizialmente, 31 verrebbero soppressi, compresi antigeni K di ceppi di origine suina. La nomenclatura degli antigeni fibrillari potrebbe essere cambiata nel prossimo futuro. Noi seguiamo questa proposta mettendo fra parentesi gli antigeni K non polisaccaridici, non fibrillari e non pili.

I risultati dell'analisi degli antigeni O, K e H (sierotipizzazione) sono presentati come un sierotipo, ad esempio:

O101 : K30 : K99 : NM (=immobile)
O149 : (K91) : K88a,c : H19[a)]
O101 : K-[b)]
O101 : K?[c)]

[a)] (K91) : non essendo di natura sicuramente polisaccaridica, tale antigene K sarà escluso dal sistema di tipizzazione.
[b)] K - : nessun antigene K.
[c)] K? : il ceppo vitale non reagisce con alcuno degli antisieri OK, né col suo antisiero-O omologo. Comunque non è stata provata la presenza di un polisaccaride capsulare.

Per produrre gli antisieri K, devono essere usate cellule non scaldate o vive o uccise con formalina, in modo da non inattivare l'antigene K. In tal modo saranno formati anticorpi contro tutti gli altri de-

terminanti antigeni del ceppo immunizzante compreso gli antigeni O e H, se il ceppo è mobile. Particolari metodi sono stati messi a punto per la produzione di sieri specifici anti-K88, K99 e P987 (vedi 11).

La sierotipizzazione di *E. coli* può essere effettuata in diversi modi, in funzione dei quesiti che ci si pone:

1. a quale sierotipo appartiene un particolare ceppo (tipizzazione sierologica completa). Questa può essere eseguita solamente in un laboratorio specializzato;
2. se un particolare ceppo appartiene ad un particolare sierotipo o se questo ha un particolare antigene, per esempio K99. Questa tipizzazione parziale può essere eseguita in ogni Centro D.V. mediante agglutinazione rapida su vetrino, a condizione che siano disponibili sieri affidabili.

6. *Sierotipi di ceppi di E. coli associati a diarrea neonatale indotta da enterotossine in suinetti e vitelli*

I ceppi enterotossici riscontrati nei suinetti possono essere suddivisi in tre classi:

a. ceppi tipici o classici (sierotipi) dei suinetti
b. ceppi con sierotipi bovini; questi ceppi possiedono l'antigene K99 (adesina) e si incontrano soprattutto in vitelli e agnelli ma anche in suinetti
c. ceppi di origine suina con altri sierotipi e di dimostrata enterotossicità.

I ceppi classici sono elencati nella Tabella 1. I sierotipi elencati nella Tabella 1 sono stati riscontrati in molti ceppi e molti paesi. Si dovrebbe rilevare che è stato osservato un mutamento nella prevalenza di particolari sierotipi. In molti paesi attualmente predomina il sierotipo O149 : (K91) : K88a c : H19.

La maggioranza dei ceppi possiede l'antigene K88, soprattutto K88ac. A scopi diagnostici può essere utilizzata la correlazione tra K88 e enterotossicità. Tuttavia si riscontrano talvolta ceppi con questi sierotipi ma privi dell'antigene K88. In tali casi viene usata per la diagnosi la correlazione tra il sierotipo (tipo OK) ed enterotossicità.

I ceppi con sierotipi bovini, ma che si riscontrano anche in suinetti,

sono elencati nella Tabella 2. Tutti questi ceppi producono ST e K99 (26). La diagnosi di diarrea indotta da enterotossina può quindi essere basata sull'evidenziazione dell'antigene K99.

7. *Identificazione dei ceppi di E. coli enterotossici bovini e suini mediante agglutinazione rapida su vetrino (sierotipizzazione parziale)*

a. Ceppi bovini

L'identificazione dei ceppi bovini è basata sull'evidenziazione dell'antigene K99. Poiché il fattore K99 è espresso in modo ottimale solo sul terreno Minca-Is, si raccomanda di usare tale terreno anche per il primo isolamento. In genere gli antisieri per le prove di agglutinazione rapida su vetrino sono diluiti in modo appropriato con soluzione allo 0,5% di NaCl addizionata dello 0,5% di fenolo. Si è visto che l'antisiero K99 quando diluito con soluzione di NaCl tamponata (NaCl 1 M in tampone fosfato di Sörensen 0,022 M, pH 7,3, mertiolato 0,001%) dà reazioni di agglutinazione più chiare. È richiesta una reazione di controllo con antisiero normale di coniglio diluito come l'antisiero K99 per escludere autoagglutinabilità. L'agglutinazione rapida su vetrino viene eseguita come segue.

1) Una goccia di antisiero K99 è posta su un vetrino portaoggetti. Un'ansata di crescita batterica è strisciata sul vetrino per 2-3 secondi e mescolata con l'antisiero. Se la coltura è sfregata sul vetrino senza antisiero per più di 5 secondi la reazione può essere significativamente più debole. Se la miscela rimane torbida, la prova di agglutinazione è negativa; si raccomanda di continuare come descritto al punto 3. La formazione di aggregati visibili a occhio nudo indica una reazione positiva. La prova su vetrino è ripetuta con siero di controllo. Se positiva, la prima reazione era aspecifica e non denotava l'antigene K99.
2) Se negativa, 3-5 colonie isolate sono trapiantate su 2 provette di agar a becco di clarino o placche di Minca-Is. Una provetta è incubata a 37°C, l'altra a 18-20°C. Il giorno successivo le colture su agar a becco di clarino incubate a 37°C sono saggiate con antisie-

ro K99. Se non si verifica agglutinazione, non è presente K99. Se questa è positiva, i risultati vanno trattati e interpretati come indicato nello schema seguente:

Coltura incubata			
a 37°C		a 18°C	
Reazione con antisiero K99	Reazione con siero controllo	Reazione con antisiero K99	Interpretazione
+	—	—	K99 - positivo
+	+	n.d.*)	autoagglutinabile K99 non indicato
+	—	+	reazione aspecifica K99 non indicato
—	n.d.	n.d.	K99 - negativo

*) n.d.: non eseguita.

3) Se solo alcune colonie della coltura primaria sono K99 - positive, può darsi che queste non siano evidenziate sotto il punto 1. Per evidenziare questi piccoli numeri, 8-10 colonie sospette *E. coli* dal terreno Minca-Is, possibilmente di varia morfologia, sono trapiantate su piastre Minca-Is, incubate a 37°C e saggiate per K99.

b. Ceppi suini

Dato che in suinetti con diarrea neonatale si ritrovano sempre più frequentemente ceppi K99+, si raccomanda l'uso di terreno Minca-Is per il primo isolamento. Per l'identificazione dei ceppi classici di *E. coli* (vedi Tabella 1) dovrebbero essere disponibili un antisiero polivalente OK contenente anticorpi K88 e anticorpi verso O138: (K81), O139: K82, O141: (K85ab), O141: (K85ac), O8: K87, O147: (K89), O149: (K91), un antisiero K88 specifico (che reagisca sufficientemente con tutte le tre varianti dell'antigene K88) e antisieri OK verso i sierotipi individuali sopra citati.

La prova è eseguita come segue:

1) la crescita sospetta della piastra di primo isolamento è saggiata mediante agglutinazione rapida su vetrino con antisiero polivalente.

Se si ha agglutinazione, si esegue il punto 2. In caso contrario va eseguito il punto 6.

2) Eseguire agglutinazione con antisiero K88: se questa è positiva procedere col punto 3; se negativa procedere col punto 5.
3) 3-5 colonie isolate sono trapiantate ciascuna su due provette d'agar a becco di clarino; una provetta è incubata a 37°C per una notte, l'altra a 18-20°C.
4) Se una o più delle colture, incubate a 37°C, agglutina con antisiero K88 dovrebbe essere eseguita la seguente reazione di controllo: la coltura cresciuta a 18°C non dovrebbe agglutinare con antisiero K88. Questa combinazione di reazioni è indicativa della presenza di antigene K88. Se la coltura a 18°C è negativa anche con antisiero polivalente, è stato provato che il ceppo possiede l'antigene K88, pur non appartenendo ai sierotipi precedentemente menzionati, ma ad esempio a O157: K88ac (vedi Tabella 1). Procedere con il punto 5.
5) Vale la pena di determinare il tipo OK del ceppo in esame, specialmente se il ceppo è negativo con siero anti-K88. La tipizzazione OK di colture $K88^-$ (Pol^+) può essere eseguita usando le piastre di primo isolamento, ma è preferibile lavorare con subcolture ottenute da colonie isolate.
   Per la tipizzazione OK di colture $K88^+$, si preferiscono colture cresciute a 20°C, poiché l'antigene K88 può mascherare l'antigene OK, se cresciute a 37°C.
6) In caso di una reazione negativa con Pol, la placca di Minca-Is è esaminata per la presenza di colonie $K99^+$ come descritto al punto a.

Se non si verifica alcuna reazione con gli antisieri polivalente e K99, il ceppo dovrebbe essere saggiato per l'antigene P987.

Sfortunatamente, le prove di agglutinazione rapida su vetrino di ceppi P987 coltivati direttamente da tamponi fecali su Minca-Is agar o agar sangue sono piuttosto inconsistenti. La ragione di questo è che esiste una variazione di fase e che generalmente solo il 10-20% delle colonie in primo isolamento possiede l'antigene. È quindi spesso inutile saggiare la presenza di antigene «K» che vi si accompagna, per esempio K103, la cui presenza è stabile. Se trapiantate su terreni solidi, il numero di colonie $P987^+$ diminuisce ulteriormente. Il loro nu-

mero può essere aumentato coltivando il ceppo in brodocoltura statica per la formazione di pellicole.

8. *Conclusioni*

Probabilmente per la possibilità che i plasmidi, che codificano per la produzione di enterotossina o adesina, siano trasferibili ad altri ceppi di *E. coli,* forse emergeranno nuove combinazioni di enterotossicità e sierotipo. Un elenco di tali ceppi riscontrati in Olanda è rappresentato nella Tabella 3. Non è possibile prevedere se tali ceppi rimarranno sporadici o se potranno venire riconosciuti e addirittura rimpiazzare i tipi ora considerati classici.

Oltre a ciò, si stanno trovando nuove adesine non correlate a quelle già descritte. Di queste, il fattore P987 sta diventando di gran lunga il prevalente.

Altre nuove adesine, come F41 Fy e F92b e Att25 sono state fino ad ora trovate principalmente insieme con K99.

La vaccinazione delle scrofe con vaccini contenenti K88 e K99 e delle vacche con vaccino K99 si sta effettuando su scala sempre più vasta. Questo potrà forse avere un effetto sulla diffusione dei sierotipi enterotossici.

Un Centro D.V. dovrebbe essere in grado di identificare i sierotipi enterotossici classici suini e bovini mediante prove di agglutinazione rapida su vetrino. Quando si riscontrano ceppi non appartenenti a tali sierotipi, ma sospetti enteropatogeni, dovrebbero essere allestite ulteriori prove, possibilmente in un laboratorio più specializzato. Si raccomanda di saggiare tali ceppi per enterotossine piuttosto che per sierotipo. I ceppi sospetti enterotossici con sierotipi non classici dovrebbero essere monitorati attentamente poiché essi potrebbero sfuggire alla protezione conferita agli allevamenti mediante vaccinazione con vaccini contenenti antigeni K88 e K99. La sierotipizzazione di questi ceppi sarà un importante contributo al programma di monitoraggio. In questo modo può essere osservata la determinazione di nuovi sierotipi. Questo potrebbe avere conseguenze sulla composizione dei vaccini così come sulla disponibilità in campo di antisieri diagnostici in base alle richieste.

BIBLIOGRAFIA

1) Burgess M.N., Bywater R.J., Cowley C.M., Millan N.A. and Newsome P.M. (1978): Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. Infect. Immun. *21*, 526-531.
2) Contrepois M., Girardeau J.F., Gouet Ph. et Desmettre Ph. (1982): Vaccination contre l'antigène K99 et d'autres «adhesines» des *Escherichia coli* bovins (in corso di stampa).
3) De Graaf F.K., Klaasen-Boor P. and Van Hees J.E. (1980): Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. Infect. Immun. *30*, 125-128.
4) Duguid J.P. (1959): Fimbriae and adhesive properties in Klebsiella strains. J. Gen. Microbiol. *21*, 271-286.
5) Edwards P.R. and Ewing W.H. (1972): Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
6) Gaastra W. and De Graaf F.K. (1982): Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Revs. *46*, 129-161.
7) Guinée P.A.M., Jansen W.H. and Agterberg C.M. (1976): Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect. Immun. *13*, 1369-1377.
8) Guinée P.A.M., Veldkamp J. and Jansen W.H. (1977): Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. Infect. Immun. *15*, 676-678.
9) Guinée P.A.M. and Jansen W.H. (1979): Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and haemagglutination. Infect. Immun. *23*, 700-705.
10) Guinée P.A.M. and Jansen W.H. (1979): Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin: a comparative study. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A *243*, 245-257.
11) Guinée P.A.M., Jansen W.H. Wadström T. and Sellwood R. (1981): *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: P.W. de Leeuw and P.A.M. Guinée (eds.) Laboratory diagnosis in neonatal calf and pig diarrhoea. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, vol. 13, Martinus Nijhoff Publishers.
12) Gyles C.L. (1979): Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Can. J. comp. Med. *43*, 371-379.
13) Isaacson R.E., Nagy B. and Moon H.W. (1977): Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88. J. Infect. Dis. *135*, 531-539.

14) MOON H.W. (1974): Pathogenesis of enteric diseases caused by *Escherichia coli*. Advanc. Vet. Sci. Comp. Med. *18*, 179-211.
15) MOON H.W., NAGY B., ISAACSON R.E. and ØRSKOV I. (1977): Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99+ enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. Infect. Immun. *15*, 614-620.
16) MORRIS J.A., THORNS C., SCOTT A.C., SOJKA W.J. and WELLS G.A. (1982): Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99-mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. Infect. Immun. *36*, 1146-1153.
17) NAGY B., MOON H.W. and ISAACSON R.E. (1976): Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and some acapsular mutants. Infect. Immun. *13*, 1214-1220.
18) OLD D.C., CORNEIL I., GIBSON L.F. THOMSON A.D. and DUGUID J.P. (1968): Fimbriation, pellicle formation and the amount of growth of salmonellas in broth. J. Gen. Microbiol. *51*, 1-16.
19) OLSSEN E. and SÖDERLIND O. (1980): Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of *Escherichia coli* porcine strains. J. Clin. Microbiol. *11*, 6-15.
20) ØRSKOV I., ØRSKOV F., SOJKA W.J. and WITTING W. (1964): K antigens K88ab(L) and K88ac (L) in *Escherichia coli*. Acta Path. Microbiol. *62*, 439-447.
21) ØRSKOV I., ØRSKOV F., JANN B. and JANN K. (1977): Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bact. Rev. *41*, 667-710.
22) POHL P., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K. et SCHOTTE M. (1982): Colibacilles entérotoxigènes du veau possédant un antigène d'attachement différent de l'antigène K99. Ann. Méd. Vét. *126*, 569-571.
23) SMITH H.W. and HALLS S. (1968): The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls enterotoxin production. J. Gen. Microbiol. *52*, 319-334.
24) SMITH H.W. and GYLES C.L. (1970): The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol. *3*, 387-401.
25) SMITH H.W. and HUGGINS M.B. (1978): The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. J. Med. Microbiol. *11*, 471-492.
26) SÖDERLIND O. (1973): Studies on *Escherichia coli* in pigs. IV. Reactions of *Escherichia coli* strains in the ligated intestine test. Zbl. Vet. Med. B. *20*, 558-571.
27) SOJKA W.J. (1965): *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Review series no. 7 of the Commonwealth Bureau of Animal Health. The Eastern Press Ltd.

TAB. 1 - SIEROTIPI DI CEPPI DI E. COLI ENTEROTOSSICI SUINI CLASSICI

Sierotipo	Ceppo standard, Centro di Referenza W.H.O. (altra designazione e riferimento bibliografico)
O8:K87:K88ab:H19	G7
O8:K87:K88ac:H19	G205
O8:K87:K88ad:H19	(H56; vedi 9)
O138:(K81):K88ac:H19	G491
O139:K82:H1*)	E4
O141:(K85ab):K88ab:H4	E68
O141:(K85ac):K88ab:H4	G1108E
O147:(K89):K88ac:H19	G1253
O149:(K91):K88ac:H10	A1
O157:K–:K88ac:H19	A2

*) I ceppi con sierotipo O139: (K82): H1 solitamente non sono enterotossici (26). Comunque sono stati recentemente descritti ceppi produttori di ST (12).

TAB. 2 - SIEROTIPI DI CEPPI DI E. COLI ENTEROTOSSICI BOVINI CLASSICI

O8:K25:K99	O20:K?:K99
O8:(K85):K99	O101:K28:K99
O9:K30:K99	O101:K30:K99
O9:K35:K99	O101:K32:K99
O9:K37:K99	O101:K(A)?:K99
O9:K(A)?:K99	O101:K–:K99

TAB. 3 - CEPPI DI E. COLI ENTEROTOSSICI SUINI CON ALTRI SIEROTIPI

Sierotipo	Enterotossina
O7:K–[a]:H4	LT
O8:K?[b]:K88ac:H19	LT
O8:K?K88ad:H19	LT
O8:K83:H21	LT
O8:K«200»[c]:H31	LT
O8:K«422»:H14	LT
O9:K(A)?[d]:K88ad	LT, ST
O9:K103:P987:NM	ST
Ox46:K103:P987:NM	ST
O9:K«2347»:K88ad:NM	LT, ST
O16:K83:H20	LT
O20:K?:K88ac:NM	LT
O35:K–:H6	LT
O45:K–:K88ac:H19 o NM	LT
O54:K–:H21	ST
O101:K103:K88ac:NM[e]	LT
O108:K–:H9	ST
O137:K–:NM	LT
O142:K–:NM	LT

[a] K–: mancante di antigene K.

[b] K?: il ceppo vitale non reagisce con alcuno degli antisieri OK classificati e neppure con il suo antisiero O omologo. Comunque non è stata dimostrata la presenza di un polisaccaride capsulare.

[c] K«200», K«422» e K«2347» sono designati in via provvisoria come antigeni K (vedi 26).

[d] K(A)?: vedi [b]. È richiesto riscaldamento a 121°C per rendere il ceppo agglutinabile col suo antisiero O omologo.

[e] Questo ceppo è pervenuto dal Dr. Pestana de Castro, Sao Paulo, Brasil.

A.D. NIGRELLI*, G. CONEDERA**, F. MELIOTA* e M. ZAVANELLA*

RILIEVI EPIDEMIOLOGICI SULLE INFEZIONI DA ESCHERICHIA COLI NEGLI ANIMALI DOMESTICI IN ITALIA

1. *Introduzione*

Le enteropatie sostenute da *E. coli* vengono classificate in diverse forme, che rappresentano altrettante entità cliniche ed anatomo-patologiche (Moon, 1974):

Forma enterotossica	: Diarrea neonatale in suinetti - vitelli - bambini. Diarrea da svezzamento in suinetti.
Forma enterotossiemica:	Malattia degli Edemi - Gastroenterite emorragica - Sindrome Shock-simile nei suinetti svezzati (Schimmelpfennig, 1970).
Forma setticemica	: Colisetticemia dei vitelli, suinetti, polli e tacchini.
Forma enteroinvasiva	: Enterite ulcerativa, simile a quella causata da Shigella.

La forma enteroinvasiva è stata riscontrata, fino ad ora solamente nell'uomo per cui i nostri rilievi epidemiologici riguardano le prime tre forme di Colibacillosi.

Riteniamo opportuno richiamare la patogenesi delle varie enteropatie da *E. coli*, di cui successivamente vedremo la situazione epidemiologica (Tabella 1).

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Brescia.
** Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Padova.

2. *Patogenesi delle infezioni da E. coli negli animali*

Le enterossicosi presuppongono un'infezione per via orale negli animali neonati, poiché il pH, ancora neutro, dello stomaco permette ai ceppi ETEC (*E. coli* enterotossici) di arrivare facilmente al piccolo intestino. Una volta giunti in questo distretto, mediante le adesine (K88, K99, P987, F41, Att25 etc.) di cui sono dotati, i ceppi enterotossici colonizzano fino a raggiungere concentrazioni di 10^7 - 10^8 germi per grammo di contenuto intestinale (Moon, 1974). La successiva tossinogenesi porta alla produzione di enterotossina termolabile (LT) o termostabile (STa ed STb) la cui azione provoca un'alterazione del sistema di controllo idro-ionico delle cellule intestinali con conseguente aumento dell'eliminazione di acqua ed elettroliti e comparsa di diarrea (Figura 1). Le perdite sono compensate con richiamo di acqua e sodio dalla rete capillare; ciò genera ipovolemia, emoconcentrazione e quindi acidosi che, nei casi gravi, porta a morte l'animale per blocco cardiaco.

Nella patogenesi delle forme enterotossiemiche del suino, che ricorrono specialmente dopo lo svezzamento, sembrano avere un ruolo decisivo, nella colonizzazione dei ceppi di *E. coli* enterotossiemigeni (ETEEC) alcun fattori condizionanti come gli stress che si concentrano allo svezzamento e l'alimentazione (Nigrelli e Zavanella, 1983).

Questi fattori portano ad una depressione dell'attività peristaltica intestinale, confermata dal costante reperto necroscopico di costipazione del grosso intestino. L'inibizione della peristalsi rende facile l'adesione dei ceppi enterotossiemici alla mucosa del piccolo intestino. Alla pullulazione batterica segue la liberazione delle due frazioni di endotossina, che a differenza delle enterotossine, non agiscono a livello intestinale, ma, una volta riassorbite, passano in circolo provocando i quadri patologici precedentemente menzionati. Le 2 frazioni sono rappresentate da:

— una frazione lipoproteica (neurotossina o vasotossina), che determina una arteriopatia degenerativa in arterie ed arteriole provocando turbe vasomotorie e grave ipertensione arteriosa. È il principio che sta alla base della Malattia degli Edemi.;
— una frazione lipopolisaccaridica, che attraverso un'azione di lisi sulle cellule e un'azione vasomotoria sui capillari sanguigni è re-

sponsabile dei quadri anatomo-clinici denominati Gastroenterite emorragica e Sindrome Shock-simile (Schimmelpfennig, 1970).

È certo che, anche nel vitello, esistono forme enterotossiemiche che riconoscono lo stesso meccanismo patogenetico (Gay, 1965; Moon, 1974).

Contrariamente alle prime due, la forma setticemica presuppone spesso una via d'infezione diversa da quella orale, la via respiratoria e orofaringea (vitello, suino, pollo, tacchino) od ombelicale (vitello, suino). I ceppi setticemici sembrano dotati della capacità di sintetizzare una sostanza detta Colicina V, grazie alla quale possono resistere alla fagocitosi ed ad altre difese dell'organismo e quindi moltiplicarsi attivamente nel sangue e in altri tessuti dotati di potere battericida (Moon, 1974). Questa forma è comunque strettamente condizionata da uno stato di immunodeficienza umorale dell'organismo ospite (mancata o insufficiente assunzione di colostro nel vitello o suino). Nel caso del pollo le situazioni di deficienza immunitaria potrebbero essere determinate dagli effetti immunodepressivi di alcune infezioni virali (Malattia di Marek, Malattia di Gumboro, Epatite a Corpi Inclusi) o da errori nella tecnologia d'allevamento (sovraffollamento). Frequente nel pollo è la forma respiratoria (aerosacculite, pericardite), che consegue ad infezione per via respiratoria e che decorre spesso associata ad infezioni da virus vaccinali o «selvaggi» a tropismo respiratorio da Micoplasmi o altri agenti batterici (P. anatipestifer), (Gross, 1972).

Prima di passare ad illustrare le varie situazioni epidemiologiche, riassumiamo le metodiche da noi utilizzate per la caratterizzazione dei ceppi di *E. coli* isolati.

3. *Metodi utilizzati per la caratterizzazione dei ceppi di E. coli*

a) Sierotipizzazione

Nell'impossibilità di eseguire una sierotipizzazione completa che, presupponendo la preparazione di un numero enorme di antisieri e la verifica della loro specificità, è alla portata di pochi laboratori specializzati, ci siamo orientati su una sierotipizzazione parziale, in modo da verificare se i ceppi da noi isolati possiedono o no uno degli antigeni somatici più frequenti per i ceppi di *E. coli* patogeni per la specie animale considerata.

I ceppi di *E. coli* isolati dal suino sono stati saggiati con gli antisieri O8, O9, O10, O20, O35, O45, O64, O78, O108, O115, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157.

I ceppi di *E. coli* isolati dal bovino sono stati saggiati con gli antisieri O8, O9, O20, O64, O101, O141, O157.

I ceppi di *E. coli* isolati dal pollo sono stati saggiati con gli antisieri O1, O2, O8, O9, O78, O108, O115, O117, O140, O141.

Gli antigeni O sono stati identificati mediante un test di agglutinazione lenta eseguito in piastra microtiter e letto dopo incubazione a 37°C per tutta la notte. Gli antisieri monospecifici O sono stati preparati secondo Guinée et al. (1981), utilizzando i sierotipi di referenza forniti dal Central Veterinary Laboratory di Weybridge (GB).

b) Identificazione dei fattori di adesione

I ceppi isolati dal suino sono stati saggiati per la presenza degli antigeni K88, K99 e P987, quelli isolati dal bovino per gli antigeni K99 ed F41. In ogni caso l'identificazione è avvenuta mediante agglutinazione rapida su vetrino, con i rispettivi antisieri preparati da noi o gentilmente fornitici da altri Istituti; (sieri di controllo per K88 e P987: Dr. M.R. Wilson, Pennsylvania University, USA - e Dr. P.A.M. Guinée, Bilthoven, The Netherlands; per K99 e F41: Dr. P.A.M. Guinée, Bilthoven, The Netherlands).

Per favorire la massima espressione dei fattori ricercati, i ceppi sono stati coltivati su Minca + Isovitalex per la ricerca del K99 e dell'F41, su agar nutritivo per il K88, su Tripticase Soy Broth + 10% di siero equino fino a formazione di una pellicola da passarsi poi su agar sangue per la ricerca del P987 (Guinée e Jansens, 1979).

c) Dimostrazione della produzione delle enterotossine

La massima produzione delle enterotossine termostabili (ST) e termolabili (LT) si ha quando il ceppo in esame viene fatto crescere in terreno di Evans in agitazione a 37°C per 18-24 ore. Il supernatante ottenuto per centrifugazione di tale brodocoltura viene quindi filtrato; il campione così ottenuto è idoneo alla ricerca sia di ST che di LT mediante le tecniche descritte successivamente.

— *Dimostrazione della enterotossina termostabile*

Si ricorre al test su topino neonato (SMT): topini lattanti di 3-4 giorni di età vengono inoculati per via intragastrica con 0,1 ml del campione in esame preparato come descritto. Vengono utilizzati 4 topini per campione che vengono sacrificati dopo 4 ore. Si determina quindi il rapporto tra il peso del pool degli intestini e quello del pool delle carcasse dei 4 topini e quando il valore di tale rapporto è uguale o superiore a 0,09, il campione viene ritenuto positivo per presenza di ST (Figura 2).

— *Dimostrazione della enterotossina termolabile*

La LT agisce su determinate colture cellulari inducendo alterazioni biochimiche misurabili: aumento dell'attività adenilatociclasica, aumento dei livelli intracellulari di AMP ciclico, sintesi di Δ, 3-chetosteroidi (Speirs et al., 1976). Queste variazioni si accompagnano ad alterazioni della morfologia cellulare, la cui evidenziazione è sicuramente più semplice ed immediata della misurazione dei parametri prima indicati. Le linee cellulari più sensibili all'effetto della LT sono: Vero, Y1, CHO.

Abbiamo scelto le Vero per relaativa facilità di coltivazione di questa linea cellulare, velocità di replicazione, chiarezza con cui le alterazioni morfologiche si presentano. I monostrati cellulari coltivati in terreno di Eagle MEM con 10% di siero fetale bovino in piastre microtiter per colture di tessuto da 96 pozzetti vengono inoculati, previo lavaggio, con 0,1 ml di terreno fresco privo di siero e contenente il campione da saggiare per LT nelle diluizioni di 1:10, 1:50, 1:100. Vengono sempre inclusi nella prova campioni sicuramente positivi e negativi. In caso di positività per LT del campione, le cellule appaiono ingrandite, rifrangenti, tondeggianti, con appendici filamentose (Figura 3a e 3b).

L'effetto è ben visibile a fresco ma può essere reso ancor più evidente da una semplice colorazione con cristalvioletto, previa fissazione del tappeto cellulare direttamente nella piastra. Nelle nostre mani, le alterazioni morfologiche iniziano ad evidenziarsi nettamente dopo circa 4 ore, ma le cellule vengono controllate ancora ad intervalli frequenti per altre 24 ore. Generalmente, a questo punto, tutti i campio-

ni positivi hanno già determinato le alterazioni cellulari e, dopo tale periodo, non solo l'effetto non diventa più marcato ma anzi si hanno delle difficoltà di lettura probabilmente dovute al fatto che le cellule risentono dell'assenza del siero nel terreno fresco di sostituzione.

4. *Epidemiologia delle enteropatie da E. coli nella specie suina*

a) Forma enterotossica

Il monitoraggio da noi eseguito riguarda 79 ceppi di E. coli isolati da suinetti lattanti affetti da enterite. Cinquanta di questi stipiti dimostrano capacità enterotossigena: 24 producono STa, 14 LT e 12 STa+LT. La percentuale di enteriti imputabili a ceppi ETEC da noi riscontrata (63,2%) è leggermente superiore a quella osservata nello stesso periodo (49%) da altri Autori (Bergeland, 1981).

Ciò è spiegabile dal fatto che la maggior parte dei soggetti da noi esaminati ha un'età inferiore ai 7 giorni di vita, periodo in cui gli animali sono particolarmente sensibili alle infezioni da *E. coli* patogeni, per i motivi illustrati nella patogenesi. In alcuni focolai si osserva l'associazione di ceppi ETEC con agenti virali (Rotavirus, Parvovirus, Coronavirus).

L'enterotossicità si rivela strettamente correlata con la presenza di strutture adesive: 35 ceppi ETEC sono dotati del fattore K88 e producono LT, STa o LT+STa; in 9 stipiti è presente l'antigene P987 e la produzione di STa ed infine 3 ceppi sono K99 positivi con capacità di produrre solo STa. Tre soli ceppi ETEC non presentano alcuna adesina (Tabella 2).

I ceppi ETEC isolati sono associati ad un ristretto numero di gruppi O: i ceppi K88 positivi ai sierogruppi 8, 141, 147, 149, 157, di cui 141, 147 e 149 nettamente più frequenti. I ceppi P987 positivi ai gruppi 9, 20, 64, 141 ed infine due dei ceppi dotati di antigene K99 sono associati al gruppo O141, mentre uno ad un gruppo non identificabile coi sieri O a nostra disposizione. In nessuno di questi ultimi 3 ceppi è riscontrato il fattore F41, osservato in associazione all'antigene K99 da alcuni Autori (Gaastra e De Graaf, 1982), (Tabella 3).

Il maggior numero di ceppi ETEC isolati rivela caratteristiche

sierologiche riferibili a sierotipi classici (presenza del fattore K88 ed associazione ai sierogruppi O8, O141, O147, O149, O157). Abbiamo tuttavia riscontrato la presenza di ceppi ETEC con determinanti antigeniche atipiche (Guinée et al., 1981); i ceppi K99$^+$ e P987$^+$ e ceppi sprovvisti di adesine conosciute. Particolarmente interessanti sono i rilievi di ceppi dotati dell'antigene K99 ed associati al gruppo 0141, fino ad ora segnalati da pochi autori solo nel vitello (Pohl et al., 1983) e ceppi P987$^+$ associati al gruppo O64 raramente osservati (Zijderveld Van, comunicazione personale).

Il rilievo di ceppi ETEC suini atipici ha due tipi di implicazioni: la necessità di disporre di antisieri almeno verso le tre adesine principali (K88, K99 e P987) per poter diagnosticare sierologicamente il maggior numero di enterotossicosi da ETEC e l'insufficienza della profilassi delle diarree neonatali da ETEC basata su vaccini contenenti il solo antigene K88.

Poiché alcuni Autori (Ørskov I. e F., 1977-79; Aura et al. 1982) hanno evidenziato una stretta correlazione tra produzione del fattore K88 e capacità di fermentare il raffinosio abbiamo saggiato 30 dei ceppi K88$^+$ da noi isolati e 30 ceppi di *E. coli* non enterotossici e K88$^-$ per la suddetta proprietà biochimica. Tutti i ceppi K88$^+$ fermentano il raffinosio, proprietà presente tuttavia anche in diversi ceppi K88$^-$: la capacità di fermentare il raffinosio non è idonea a discriminare i ceppi dotati del fattore K88 da quelli K88 negativi.

b) Forma enterotossiemica

È la forma che provoca, nel nostro paese, i danni economici più elevati a causa delle difficoltà che si incontrano nel controllo e dell'alta mortalità con cui decorre.

I rilievi riguardano 100 ceppi di *E. coli* isolati dai linfonodi meseraici e dal piccolo intestino di suinetti svezzati venuti a morte per Entefotossiemia (Malattia degli Edemi, Gastroenterite emorragica o Sindrome Shock-simile). Come si può osservare in Tabella 4 l'83% dei ceppi isolati sono associati a soli 3 sierogruppi O dei 167 classificati, e precisamente: O39 (37%), O141 (34%), O149 (12%), O138 (1%), O45 (1%), altri (15%). I ceppi associati al gruppo O139 sono dotati dell'antigene capsulare K82, mentre quelli con gruppo O141

presentano l'antigene K85 ab o ac, ad eccezione dei 5 ceppi O141 dotati di adesine (l'identificazione degli antigeni K non veniva eseguita sistematicamente su tutti i ceppi).

I ceppi O139 sono più frequentemente associati a Malattia degli Edemi, mentre i ceppi O141 a quadri riferibili a Gastroenterite emorragica o Sindrome da Shock. Questo conferma l'ipotesi che la neurotossina responsabile della Malattia degli Edemi sia prodotta solamente da un limitato numero di sierotipi: O139:K82 e O141:K85 ab o ac (Nielsen, 1981).

Raramente è presente capacità enterotossigena e adesine: solamente 9 ceppi sono ETEC e dotati di antigeni adesivi; di questi 4 ceppi $K88^+$ ed LT^+ sono associati al gruppo O149 e 5 al gruppo O141 (Tabella 4).

La presenza di enterotossigenicità in ceppi ETEC (*E. coli* enterotossiemogeni) spiega la presenza, seppur rara, di casi sporadici di diarrea in focolai di enterotossiemia. D'altronde forme di enterotossicosi neonatale possono essere complicate da morte improvvisa per shock da endotossina (Moon, 1974).

La mancanza di strutture adesive diverse dai comuni pili di tipo 1 conferma l'ipotesi, espressa inizialmente, sul ruolo determinante nella colonizzazione dei ceppi enterotossiemici esercitato da alcuni fattori (Nigrelli e Zavanella, 1983).

Un'ultima caratteristica, da noi evidenziata è la costante capacità dei ceppi enterotossiemigeni di produrre B-emolisina, al contrario di quanto accade per i ceppi enterotossici. Tale caratteristica può essere utilizzata come primo «screening» diagnostico dei ceppi enterotossiemigeni.

c) Forma setticemica

Il limitato numero di ceppi setticemici da noi isolati rispecchia la scarsa frequenza delle Colisetticemie nei suinetti che, anche quando si manifestano, colpiscono solo 1 o 2 suinetti per nidiata e non rappresentano quasi mai problema d'allevamento, diversamente da quanto accade per il vitello. Probabilmente il motivo di questa diversità è dovuto alla differente tecnologia di allevamento, per cui il suinetto ha comunque la possibilità naturale di assumere colostro col suo alto

contenuto di IgG. Nel caso del vitello, separato dalla madre alla nascita, la possibilità di assumere anticorpi colostrali è subordinata alla cura dell'allevatore.

I ceppi da noi isolati dal S.N.C. di suinetti venuti a morte per Colisetticemia, non sono enterotossici, non possiedono adesine, e sono associati a gruppi O diversi da quelli caratteristici dei ceppi ETEC (Tabella 5).

Ciò conferma la diversa e separata patogenesi della forma enterotossica e setticemica. Il sierogruppo più frequentemente riscontrato è il gruppo O78 che, come si verifica per altri gruppi O associati a ceppi setticemici, ricorre spesso nelle forme setticemiche di altre specie, come vedremo successivamente nel pollo (Ørskov I. e F., 1977). Nelle forme enterotossiche si assiste invece ad una maggiore specificità della specie ospite.

5. *Indagini epidemiologiche preliminari sulla colibacillosi enterotossica del vitello*

Abbiamo da poco iniziato a raccogliere dei dati, da considerarsi per ora come preliminari, sulle forme di colibacillosi del vitello, prestando maggior attenzione alla forma enterica, o più correttamente enterotossica, piuttosto che alla forma setticemica in quanto quest'ultima parrebbe costituire un problema solo in presenza di determinate cause predisponenti, prima fra tutte la mancata o insufficiente somministrazione di colostro al vitello neonato.

Ceppi di *E. coli* sono stati isolati dalle feci o dal contenuto intestinale e dai linfonodi meseraici di 117 vitelli affetti da diarrea di età compresa tra il primo ed il ventesimo giorno di vita. Questi ceppi sono stati saggiati mediante agglutinazione rapida su vetrino per la presenza degli antigeni K99 e F41, che sono le principali adesine che si rinvengono nei ceppi enterotossigeni (ETEC) di bovino. In breve, mentre per il K99 è indiscusso il ruolo di fattore di virulenza per i ceppi di E. coli che lo possiedono e che molte delle sue caratteristiche sono da tempo ben note, molto meno si sa sull'F41: si ritrova generalmente su ceppi che possiedono anche il K99 ma dal punto di vista antigenico e strutturale è totalmente diverso da esso; è in grado di emoagglutinare globuli rossi di pecora in presenza di D-mannosio ed

ha proprietà adesive in vitro e, quasi certamente, anche *in vivo* (Morris et al., 1982).

Da 15 dei 117 campioni esaminati sono stati isolati ceppi possedenti le adesine K99 e F41 da noi cercate; pertanto la percentuale di campioni positivi per presenza di tali adesine è risultata del 13%. I nostri risultati concordano così con quelli di Autori di altri Paesi, secondo cui gli ETEC sono responsabili dal 12 al 30% dei casi di diarrea nei vitelli fino alle 3 settimane di età (Contrepois et al., 1980). Siamo quindi risaliti all'età dei 15 vitelli con enterite da cui erano stati ottenuti i campioni positivi e, dopo aver suddiviso il periodo di vita da 0 a 20 giorni da noi considerato in tre classi di età e cioè da 0 a 5 giorni, da 5 a 10 giorni e da 10 a 20 giorni, abbiamo osservato che la percentuale di vitelli con enterite imputabile a ETEC è risultata maggiore (21,7%) negli animali appartenenti alla prima classe di età, mentre è diminuita progressivamente con l'aumentare dell'età. Nonostante il numero di dati nelle nostre mani sia ancora limitato, questi risultati ci portano ad affermare che ceppi di *E. coli* K99 positivi tendono a determinare gravi fenomeni diarroici soprattutto nei primi giorni di vita del vitello: l'infezione viene infatti generalmente contratta in tempi subito successivi alla nascita; ciò è in accordo con quanto riportato da vari AA (Contrepois et al., 1980).

In 4 casi, nella prima classe di età, i ceppi ETEC sono risultati associati ad agenti virali (Rotavirus e Coronavirus) mentre nella seconda e nella terza ciò si è verificato in un solo caso. (Tabella 6)

Per quanto riguarda il tipo di adesina rinvenuta, nei ceppi isolati dai 15 campioni positivi summenzionati è stato evidenziato l'antigene K99, mentre l'adesina F41 è stata rinvenuta in associazione ad esso in due dei 15 campioni. Dalla letteratura risulta che l'antigene F41 viene generalmente rinvenuto in ceppi che possiedono anche l'antigene K99. (Tabella 8).

È stata inoltre eseguita una «sierotipizzazione parziale» sui ceppi isolati usando sieri contenenti anticorpi nei confronti degli antigeni somatici O8, O9, O20, O64, O101, O141, O157. Vari Ricercatori (Guinée e Jansen, 1979) sostengono che i ceppi K99 positivi tendono a rientrare in un numero ristretto di sierotipi e che gli antigeni O da essi generalmente posseduti sono: O8, O9, O20, O101. I nostri ceppi K99 positivi e K99+F41 positivi possiedono, così come illustrato in figura, i seguenti antigeniO: O9, O64, O101, O141. È da notare come

6 ceppi non possiedano un sierotipo «classico»: per uno l'antigene O non è stato identificato, un ceppo è provvisto di antigene O64 e ben 4 possiedono l'antigene O141 che invece è assai frequente fra i ceppi responsabili di colibacillosi nel suino. Anche Pohl et al. (1983), del resto, in una recente indagine su ceppi di *E. coli* patogeni per l'intestino del vitello, hanno indicato l'antigene O141 tra i più frequenti antigeni somatici associati a pili K99 nei ceppi da loro esaminati. (Tabella 7)

Va inoltre rilevato che in uno dei ceppi F41 è stato evidenziato l'antigene somatico O9, mentre nell'altro l'antigene O141. Ciò riveste probabilmente un certo interesse: Morris et al. (1982), esaminando ceppi di *E. coli* raccolti in un periodo compreso tra il 1978 ed il 1981 hanno infatti individuato l'antigene F41 esclusivamente in *E. coli* possedenti l'antigene somatico O101 o l'antigene O9.

È nota la correlazione esistente per i ceppi di *E. coli* di vitello tra presenza di antigene K99 e capacità di produrre enterotossina termostabile (ST); poiché però sono recentemente apparsi alcuni lavori (Pohl et al., 1983) in cui vengono descritti ceppi enterotossigeni sprovvisti di antigene K99 e forniti di nuove adesine (Fy, F92B, Att 25) o di adesine non ancora identificate, abbiamo in programma di saggiare tutti i ceppi isolati per la ST. Anticipiamo però che, in un'indagine condotta in tal senso, abbiamo sottoposto alla prova del topino neonato (SMT) per ST un piccolo numero di ceppi accomunati dal fatto di essere K99 negativi e di possedere però un antigene O fra quelli più comuni nei ceppi ETEC: l'esito è stato negativo.

6. *Rilievi epidemiologici sulle forme setticemiche e respiratorie del pollo sostenute da Escherichia coli*

Nel pollo le infezioni enteriche da *E. coli* sono del tutto secondarie, mentre ai primi posti nella patologia aviare, a causa dei danni economici che provocano, sono le forme setticemiche e respiratorie (aerosacculiti e pericarditi). L'indagine da noi eseguita riguarda 130 ceppi di *E. coli* isolati da focolai di Setticemia, Aerosacculite o Pericardite.

Il 60% dei ceppi è associato a pochi sierogruppi O: O78 (28,5%);

O2 (15,3%); O141 (9,2%); O9 (3%); altri (3%); il 39% appartiene a gruppi O non identificabili dai nostri antisieri O (Tabella 8).

Non si è proceduto all'identificazione degli antigeni capsulari, tuttavia i ceppi associati al gruppo O 141 presentano uniformemente un antigene K di tipo A, resistente cioè al riscaldamento per 1 h. a 100°C.

Il ristretto numero di sierogruppi O associati a ceppi setticemici aviari ci porta ad ipotizzare la possibilità di una profilassi immunizzante di queste forme, basata su vaccini inattivati contenenti ceppi di *E. coli* appartenenti ai gruppi O più frequenti. A tal scopo è in via di sperimentazione nel nostro Istituto un vaccino spento contenente ceppi di gruppo O78, O2 e O141 in adiuvante oleoso.

BIBLIOGRAFIA

1) Aura G. de Lopez, Solomon Kadis and Emmet B. Scotts (1982): Transfer of drug resistence and enterotoxin in porcine *Escherichia coli* strains and relationship between K88 antigen and raffinose fermentation. Am. J. Vet. Res., *43*, n. 3, 499-501.
2) Bergeland M. (1980): Enteric and respiratory diseases. Kans Swine Health Day Proceedings. In Leman A.D. et al. (1981).
3) Contrepois M., Dubourguier H.C., Girardeau J.P. et Gouet Ph. (1980): Methodes de diagnostic des infections a *E. coli* entéropathogénes chez le veau et donnés épidémiologiques. Bull des G.T.V., *80*, n. 4, bis-B, 25-36.
4) De Graaf F.K. and Roorda I. (1982): Production, purification and characterisation of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. Infection Immunity, *36*, 751-758.
5) De Leeuw P.W. and Guinée P.A.M. (1981): Laboratory Diagnosis in neonatal caff and pig diarrhoea. Current topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Martinus Nijhoff, *13*.
6) Gaastra W. and De Graaf F.K. (1982): Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Revs., *46*, 129-161.
7) Gay C.C. (1965): *Escherichia coli* and neonatal diseases in calves Bacteriologicl. Reviews, *29*, n. 1, 75-96.
8) Gross W.B. (1972): Colibacillosis. In Hosftad M.S. et al. (1972).
9) Guinée P.A.M., Jansen W.H. and Agterberg C.M. (1976): Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. Infect. Immun., *13*, 1369-1377.

10) GUINÉE P.A.M. and JANSEN W.H. (1979): Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origine: a comparative study. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig., *A 243*, 245-257.
11) GUINÉE P.A.M., JANSEN W.H., WADSTRÖM T. and SELLWOOD R. (1981): *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In DE LEEUW P.W. and GUINÉE P.A.M. (1981).
12) HOSFTAD M.S., CALNEK B.W., HELMBOLDT C.F., REID W.M. and YODER Jr. H.W. (1972): Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames.
13) LEMAN A.D., GLOCK R.D., MENCELLING W.L., PENNY R.H.C., SCHOLL E. and STRAW B. (1981): Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames.
14) MOON H.W. (1974): Pathogenesis of enteric diseases caused by *Escherichia coli.* Advanc. Vet. Sci. Comp. Med., *18*, 179-211.
15) MORRIS J.A., THORNS C., SCOTT A.C. SOJKA W.J. and WELLS G.A. (1982): Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99-mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. Infection Immunity, *36*, 1146-1153.
16) NIELSEN N.O. (1981): Oedema Disease. In LEMAN A.D. et al. (1981).
17) NIGRELLI A., CONEDERA G. e ZAVANELLA H. (1983): Presenza e caratteristiche di ceppi di *E. coli* enterotossigeni (ETEC) in suinetti neonati affetti da enterite. Selezione Veterinaria, *24*, n. 3, 295-299.
18) NIGRELLI A. e ZAVANELLA M. (1983): Le infezioni da *Escherichia coli* nel suinetto prima e dopo lo svezzamento: prevenzione e trattamento immunizzanti. Selezione Veterinaria, *24*, n. 3, 383-410.
19) ØRSKOV I. and ØRSKOV F. (1977): Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli.* Bact. Rev., *41*, 667-710.
20) ØRSKOV I. and ØRSKOV F. (1979): Special *Escherichia coli* serotypes from enteropathies in Domestic Animals and Man. In WILLINGER H. and WEBER A. (1979).
21) POHL P., LINTERMANS P., KAECKENBEECK, DE MOL P., VAN MUYLEN K. et SCHOTTE M. (1983): Existence de différents types d'*Escherichia coli* pathogénes pour l'intestin du veau. Ann. Méd. Vét., *127*, 37-41.
22) RENAULT L. (1980): Place des virus et des *E. coli* entéropathogénes dans les gastro-entérites néonatales des veaux. Bull. des GTV, *80-bis B*, n. 191, 53-60.
23) SCHIMMELPFENNIG VON H. (1970): Untersuchungen Zur Ätiologie Der Ödemkrankeit des Schweines. Paul Verlag Ed. in Berlin.
24) SPEIR J.I., STAVRIC S. and KONOWALCHUK J. (1977): Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells.Infection Immunity, *16*, 617-622.
25) WILLINGER H. and WEBER A. (1979): *Escherichia coli* infections in domestic animals. Paul Parey Verlag, Berlin-Hamburg.

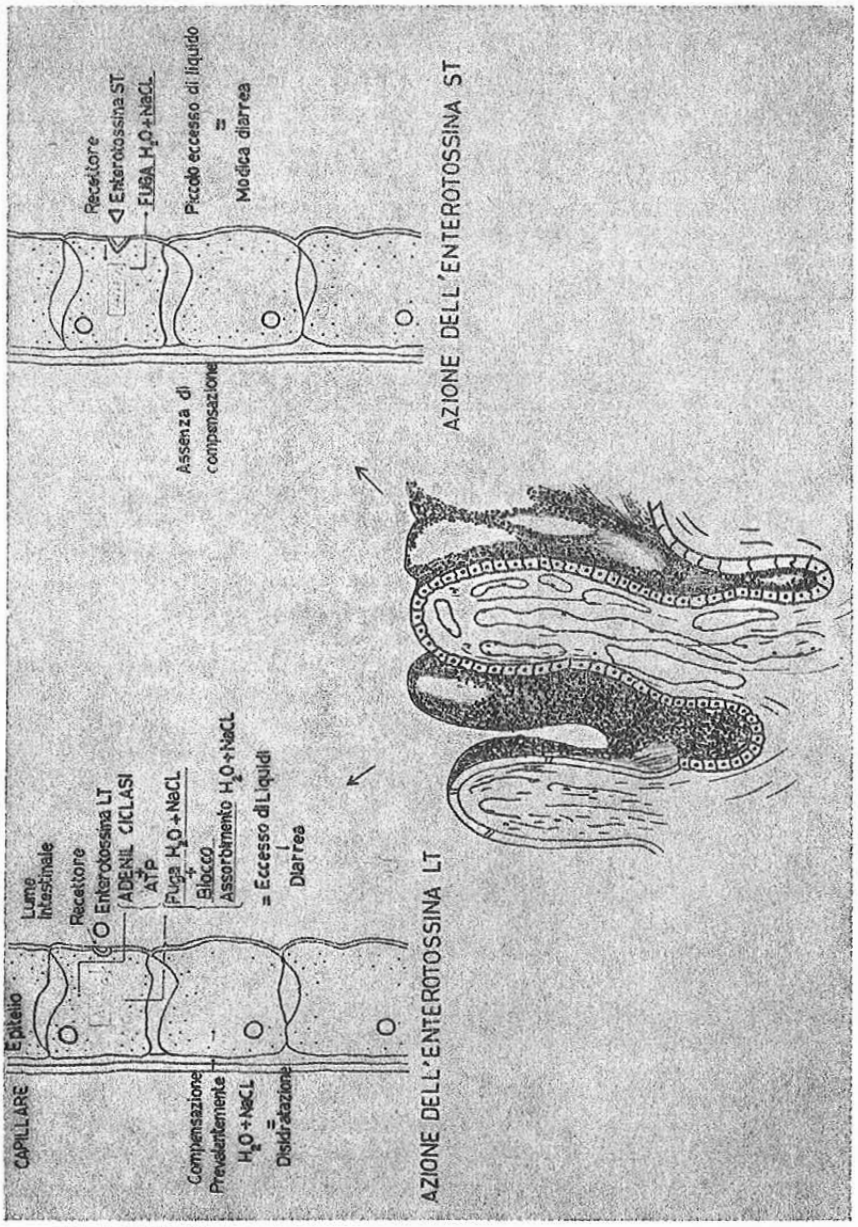


FIG. 1 - Meccanismo d'azione delle enterotossine termostabile (ST) e termolabile (LT).

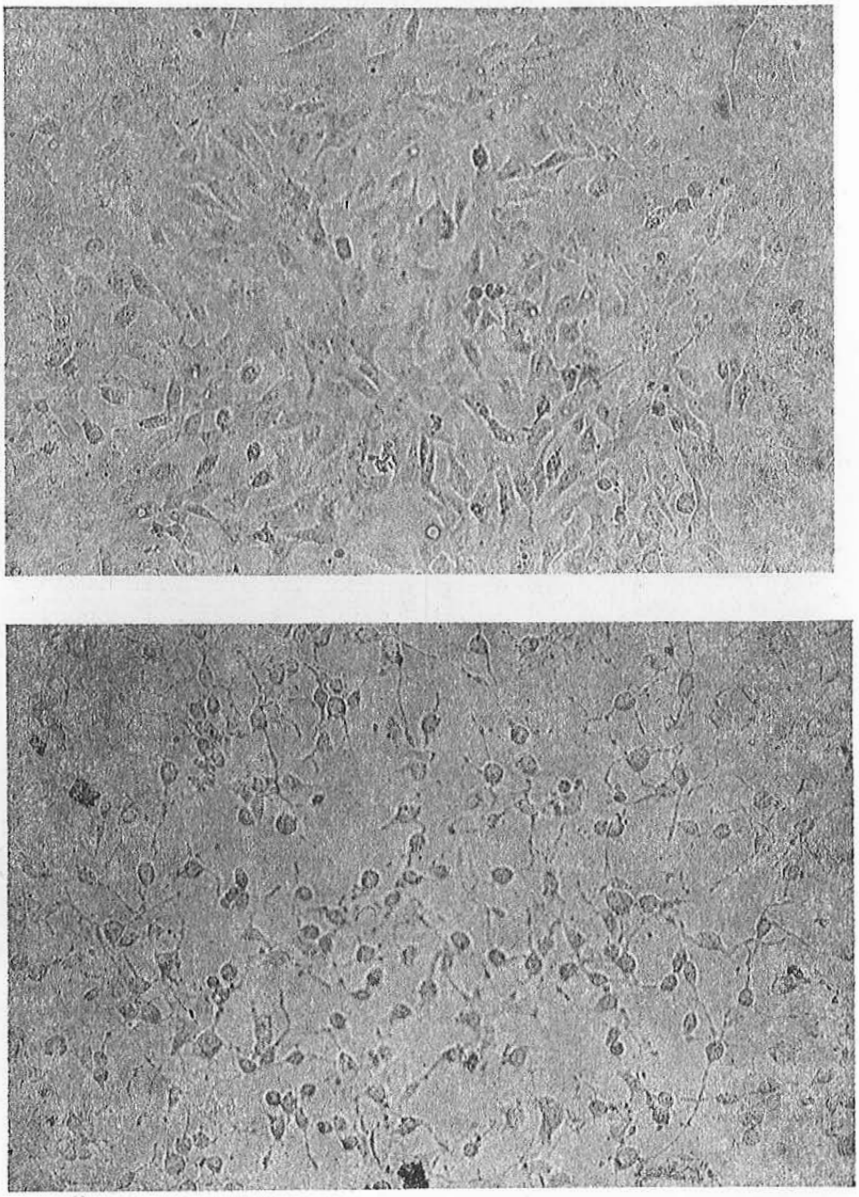


FIG. 3 - Test su cellule Vero per la determinazione della enterotossina termolabile (LT):

sopra) monostrato cellulare inoculato con campione negativo

sotto) monostrato inoculato con campione positivo: si notano cellule rifrangenti, tondeggianti con appendici filamentose. I monostrati sono preparati a fresco ad ingrandimento 20x.

TAB. 1 - PATOGENESI DELLE ENTEROPATIE DA E. COLI NEGLI ANIMALI

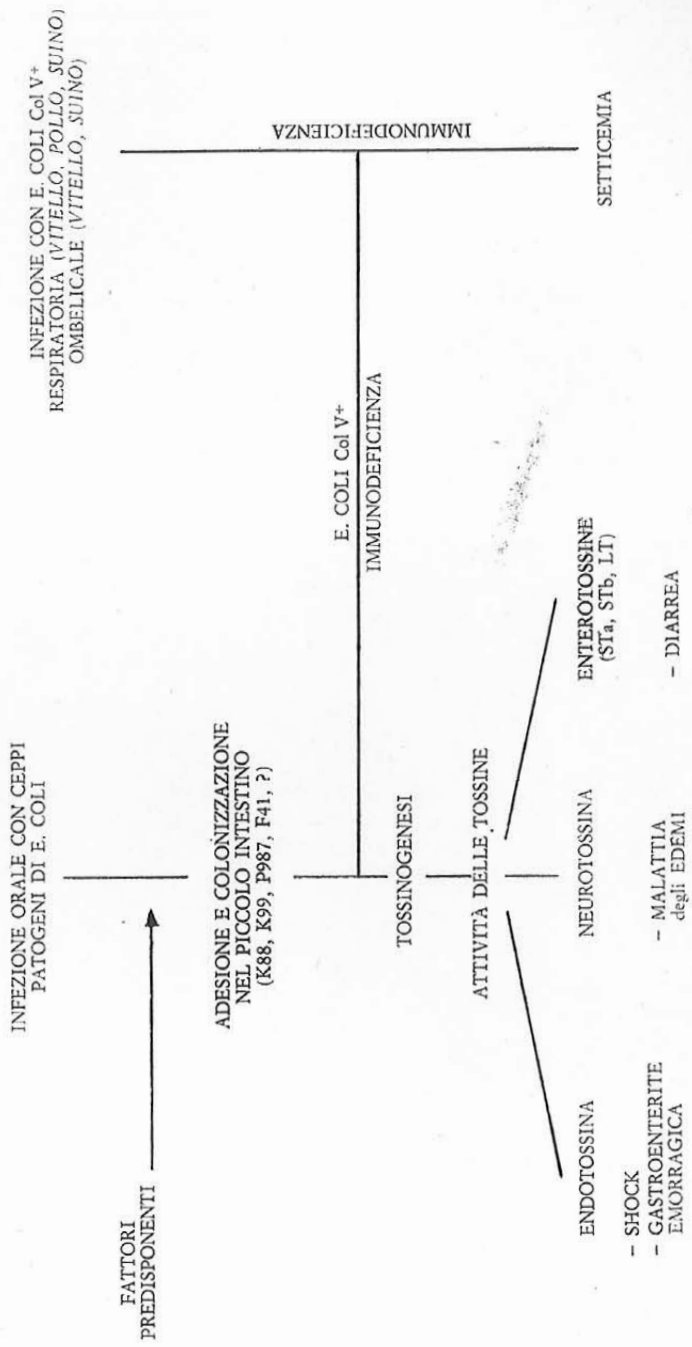


FIG. 2 - Test su topino neonato per svelare la presenza di enterotossina termostabile (ST): campione negativo (sotto) e campione positivo (sopra). Si noti l'aumento di volume e del grado di distensione delle anse intestinali del campione positivo.

TAB. 2 - CORRELAZIONE TRA PRESENZA DI ADESINE ED ENTEROTOSSICITÀ IN 79 CEPPI DI E. COLI ISOLATI DA SUINETTI LATTANTI AFFETTI DA ENTERITE

Fattori adesivi	TIPO DI ENTEROTOSSINA PRODOTTA				TOTALE CEPPI ETEC	TOTALE CEPPI Saggiati
	STa	LT	STA+LT	Nessuno		
K 88	12	12	11	—	35	35
K 99	3	—	—	—	3	3
P987	9	—	—	—	9	9
Nessuno	—	2	1	29	3	32
TOTALE	24	14	12	29	50	79

TAB. 3 - CORRELAZIONE TRA PRESENZA DI ADESINE E SIEROGRUPPO O IN 50 CEPPI ETEC DI ORIGINE PORCINA

AG O	Numero ceppi	K 88	K 99	P 987	Nessuno
8	4	3	—	—	1
9	2	—	—	2	—
20	3	—	—	3	—
64	2	—	—	2	—
138	1	—	—	—	1
141	14	10	2	2	—
147	11	11	—	—	—
149	9	9	—	—	—
157	2	2	—	—	—
N. I.*	1	—	—	—	1

* Non identificati.

TAB. 4 - DATI EPIDEMIOLOGICI DI 100 CEPPI E. COLI ASSOCIATI A SINDROMI ENTEROTOSSICHE POST-SVEZZAMENTO NEL SUINO

Antigene O	N. Ceppi	Pili tipo 1	K 88	K 99	P 987	ETEC	Emolisi %
149	12	—	4	—	—	4	100
141	34	13	3	—	2	5	100
139	37	—	—	—	—	—	100
138	1	1	—	—	—	—	100
45	1	—	—	—	—	—	100
Altri	3	1	—	—	—	—	100
non identificati	12	2	—	—	—	—	100
TOTALE	100	17	7	—	2	9	100

TAB. 5 - SIEROGRUPPI O DI CEPPI NON ENTEROTOSSICI DI E. COLI ISOLATI DA CASI DI SETTICEMIA IN SUINETTI

Antigene O	Numero dei Ceppi	FATTORI DI ADESIONE			
		K 88	K 99	P 987	F 41
1	1	—	—	—	—
9	2	—	—	—	—
78	3	—	—	—	—
115	1	—	—	—	—
117	1	—	—	—	—
139	1	—	—	—	—
143	1	—	—	—	—
TOTALE	11	—	—	—	—

TAB. 6 - PRESENZA DI VITELLI POSITIVI PER E. COLI ENTEROTOSSICI SU 117 SOGGETTI AFFETTI DA ENTERITE NEONATALE

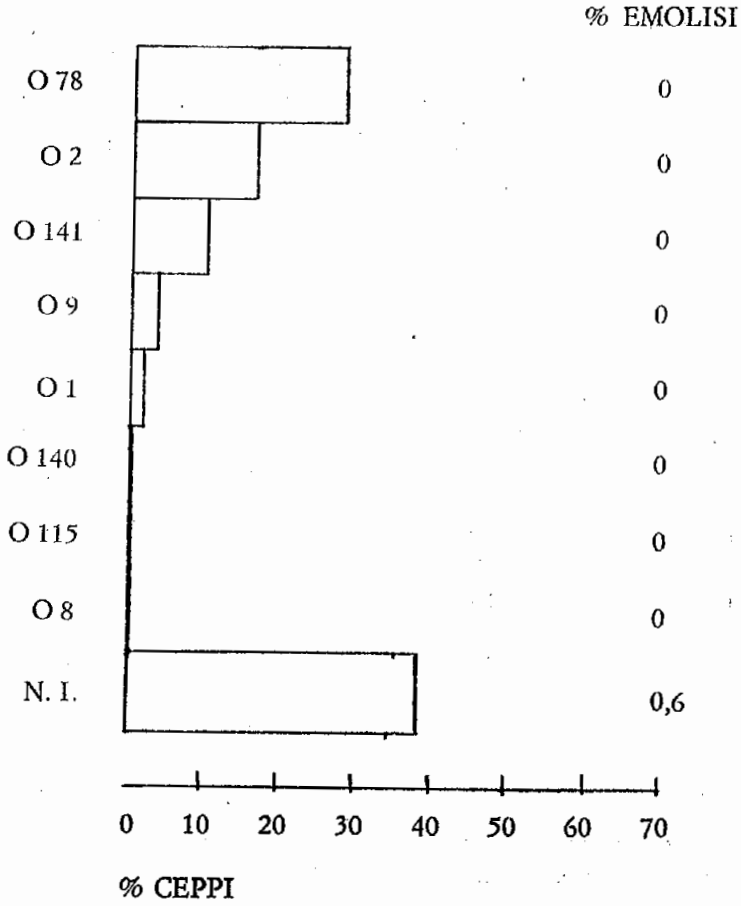
	ETÀ (giorni)			
	0-5	6-10	11-20	0-20
VITELLI POSITIVI / VITELLI ESAMINATI	10/46	4/47	1/24	15/117
di cui associati ad agenti virali	4	1	1	6

TAB. 7 - CORRELAZIONE TRA SIEROGRUPPO O E PRESENZA DEI FATTORI ADESIVI K99 ED F41

AG O	Numero Ceppi	K 99	F 41
O 9	6	6	1
O 64	1	1	—
O 101	3	3	—
O 141	4	4	1
N. I.	1	1	—

Il fattore F 41 era associato all'adesina K 99.

TAB. 8 - SIEROGRUPPI DI 130 CEPPI DI E. COLI ASSOCIATI A SETTICEMIE, AEROSACCULITI E PERICARDITI NEL POLLO



R.G. HESS, P.A. BACHMANN e G. BALJER *

SIGNIFICATO DELL'INFEZIONE DA ROTAVIRUS NELLA DIARREA DEI VITELLI NEONATI INDOTTA DA E. COLI ENTEROTOSSICI

Introduzione

La diarrea neonatale acuta del vitello è una malattia diffusa in tutto il mondo, considerata responsabile delle più gravi perdite economiche negli allevamenti sia da latte che da carne. Il numero di agenti eziologici che sono ritenuti coinvolti nella sindrome è molto elevato (1, 5, 6, 19). In feci diarroiche sono stati osservati molti virus, accanto a batteri enteropatogeni, come *Escherichia coli* enterotossici (= ETEC), *Salmonellae* e *Campylobacter fetus,* e microrganismi, come *Chlamydia* e *Cryptosporidia.* Agenti come *rotavirus, pararotavirus, coronavirus, minicoronavirus* (*paracorona*), *virus BVD, adenovirus, parvovirus, astrovirus* e *calicivirus* sono stati considerati agenti causali della malattia quando venivano trovati da soli o in combinazione (Tabella 1). Ma solamente alcuni di essi sono stati indicati come agenti primari cioè capaci di causare diarrea sperimentale in vitelli neonati sia gnotobiotici che convenzionali (14, 17, 25).

I due agenti che si riscontrano più comunemente nelle epidemie di campo in differenti paesi sono ETEC e *rotavirus* (5, 6, 19). Comunque resta da chiarire quale importanza abbia la presenza di entrambi gli agenti in tali epidemie riguardo alla gravità della malattia.

Ci sono alcune relazioni sulle infezioni sperimentali miste con entrambi *rotavirus* e ETEC, ma tra di esse non vi è accordo di risultati (15, 22, 23, 24). I nostri studi furono intrapresi per ottenere ulteriore informazione sulla natura dell'interazione fra i due agenti dopo infezioni miste di vitelli neonati privati di colostro.

* Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenmedizin, Ludwig Maximilians Universität. Tierärztliche Facultät - München, Deutschland.

Materiali e metodi

— Vennero usati venti vitelli neonati della razza tedesca «Fleckvieh».
— Tutti i vitelli furono fatti nascere per parto cesareo, trasferiti in un recinto d'isolamento e allevati in condizioni SPF.
— Le condizioni SPF furono monitorate mediante prove di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) di feci verso *coronavirus bovino, parvovirus bovino* e *agente di Breda*, mediante indagine sierologica di anticorpi verso i virus BVD, IBR e PI-3 e mediante colonizzazione batterica in vitro sui terreni agarizzati nutritivo e Minca.
— I vitelli furono privati di colostro e alimentati con quattro litri di latte di vacca in polvere ricostituito privo di anticorpi anti-*rotavirus* al giorno.
— Diciotto vitelli furono infettati con uno dei due agenti o con ambedue entro le prime 24 h di vita; due vitelli servirono come controlli non infettati.
— Nelle infezioni miste *rotavirus*/ETEC i vitelli ricevettero 10^7 organismi ETEC (B 41; O101, $K99^+$, ST^+), una dose che non induceva diarrea quando somministrata da sola. Il secondo inoculo, con *rotavirus bovino,* fu fatto in diversi regimi secondo lo schema seguente:

  Gruppo 1: infezione solo con ETEC (C11, C16, C50)

  Gruppo 2: infezione con *rotavirus* da solo (C18, C25, C28, C29, C40, C52)

  Gruppo 3: infezione con *rotavirus* seguita da infezione con ETEC 12-14 h più tardi (C22, C23)

  Gruppo 4: *rotavirus* e ETEC furono inoculati simultaneamente (C26, C36, C51, C53)

  Gruppo 5: infezione con ETEC fu seguita da infezione con *rotavirus* 15-36 h più tardi (C17, C27)

  Gruppo 6: controlli non inoculati (C12, C42).
— Furono raccolti campioni fecali due volte al giorno per quantificare batteri e virus presenti.
— Alla fine dell'esperimento vennero prelevati cinque diversi tratti intestinali (digiuno pross. med. dist., ileo, colon). Ciascun tratto fu suddiviso in tre porzioni: 5 cm per il conteggio batterico e la

identificazione, un pezzo da 1 cm per esaminare l'antigene virale e il contenuto infettante e una porzione legata di 5 cm fu fissata intraluminalmente per la microscopia in campo chiaro ed elettronica.

— Furono raccolte porzioni di linfonodi mesenterici, fegato, milza e rene per indagine virale e batterica.
— Fu realizzato l'esame dell'antigene *rotavirus* in campioni di feci e di tessuto usando una tecnica ELISA a doppio «sandwich» (3).
— Fu eseguita titolazione dell'infettività del *rotavirus* in provette rotanti di cellule Ma 104 di 3 giorni.
— I batteri presenti in e sulle mucose furono contati e identificati dopo omogeneizzazione della mucosa isolata e coltivati sui terreni agarizzati nutritivo e Minca. Fu provata la capacità di produrre enterotossina (ST) usando il saggio del topo neonato (9). Gli antigeni K99 e O101 furono identificati mediante prove di agglutinazione (14).

Risultati

Osservazioni cliniche: non si osservarono sintomi clinici di diarrea o perdita di appetito nei vitelli controllo del gruppo 6 (C12, C42). Nell'ambito del gruppo 1 (Tabella 2) solo C11 sviluppò diarrea acquosa 8 h dopo l'inoculazione di 10^{10} organismi ETEC, mentre C16 e C50, i quali avevano ricevuto entrambi 10^7 organismi, rimasero sani durante l'intero periodo.

Nel gruppo 2 (monoinfezione con *rotavirus*) non si verificò diarrea prima di 24 h dopo l'infezione (Tabella 3). Nell'ambito di questo gruppo il tempo d'incubazione variò tra 24 e 38 h, con una media di 29 h. La diarrea fu lieve e transitoria in tutti i vitelli sottoposti a prolungata osservazione (Figura 1). La più lunga durata di diarrea fu di 17 h in C40 e 25 h in C52. Fu eseguita necroscopia di C18 e C25 a 24 h dall'infezione, periodo in cui non avevano manifestato diarrea.

La risposta clinica di quei vitelli che furono infettati con *rotavirus* seguiti da 10^7 organismi ETEC (gruppo 3) o simultaneamente con entrambi gli enteropatogeni (gruppo 4) fu molto più grave (Tabella 4). Tutti i vitelli eccetto C23 manifestarono diarrea acquosa. Si osservò

che due vitelli erano disidratati al momento della necroscopia (C36 a 31 h e C51 a 57 h dall'infezione). Il tempo d'incubazione variava tra 19 e 24 h dopo infezione con *rotavirus*, in media 22 h. In tutti gli animali di questi due gruppi, la diarrea si accompagnava a una riduzione dell'appetito che permaneva fino a che i vitelli venivano sottoposti a necroscopia (C22 per 11 h, C23 per 25 h, C26 per 5 h, C36 per 7 h, C51 per 33 h, C53 per 81 h). Un aumento nella risposta febbrile di più di 1°C fu osservato in C26 e C36.

In quei vitelli in cui l'inoculazione di 10^7 organismi ETEC fu seguita da infezione con *rotavirus* (gruppo 5) non si manifestò quasi nessun sintomo. C27 mostrò feci molli oltre un periodo di 19 h cominciando 20 h dopo l'infezione con *rotavirus* (Tabella 4).

Conteggio di ETEC nella Mucosa Intestinale: i risultati sul conteggio di ETEC sono dati nelle Tabelle 2 e 5. Nei tratti intestinali inferiori di C11 (inoculato con 10^{10} ETEC) furono contati da 10^7 a 10^8 ETEC nel momento in cui il vitello manifestò diarrea acquosa. In C16 furono trovati nei campioni intestinali da 10^6 a 10^7 ETEC, mentre in C50, che fu sacrificato 48 h più tardi di C16, furono trovati nei tratti corrispondenti solo piccoli numeri di ETEC (da 10^3 a 10^6). In C16 e C50 furono individuati *Serratia liquefaciens* e organismi non-ETEC (da 10^2 a 10^3). I vitelli controllo C12 e C42 avevano da 10^2 a 10^4 non-ETEC nei campioni intestinali (Tabella 2).

La Tabella 5 riguarda la presenza di ETEC in vitelli con infezione doppia. Nell'intestino degli animali del gruppo 3 si contarono da 10^5 a 10^7 ETEC. Nei vitelli del gruppo 4 (infezione simultanea con ETEC e *rotavirus*) furono trovati tra $10^{3,5}$ e 10^8 ETEC. In C53, comunque, non poterono essere trovati ETEC. Questo vitello fu sottoposto a necroscopia 81 h dopo la comparsa della diarrea. In tre vitelli di questo gruppo erano anche presenti nella mucosa non-ETEC e *Serratia liquefaciens* con da 10^3 a 10^4 UFC.

Nei campioni intestinali di C17 e C27 (gruppo 5), in cui l'inoculazione di ETEC fu seguita da inoculazione di *rotavirus* da 15 a 36 h dopo, furono contati tra 10^3 e $10^{5,2}$ ETEC.

Escrezione di *Rotavirus* nelle Feci: l'escrezione di *rotavirus* nei vitelli inoculati con *rotavirus* da solo (gruppo 2) cominciò da 17 a 38 h (media 25,5 h) dopo l'infezione (Figura 1a). I titoli massimi furono ottenuti tra 22 h (C28) e 68 h (C52) post infezione. In tutti gli animali convalescenti i titoli relativi all'antigene virale nelle feci erano

scesi dal momento della necroscopia (C28: 78 h post inf.; C29: 34 h post inf.; C40: 95 h post inf.; C52: 116 h post inf.).

La Figura 1b dimostra il modello di escrezione di *rotavirus* nelle feci di vitelli infettati con *rotavirus*/ETEC (gruppo 3). Un netto aumento nei titoli ELISA fu osservato appena prima e all'insorgenza della diarrea cominciando 20-24 h dopo l'inoculazione di *rotavirus*. I titoli ELISA raggiunsero i maggiori valori 46 e 98 h dopo l'infezione e rimasero a questo livello fino alla necroscopia (Tabella 3).

Furono osservati solo titoli molto bassi nelle feci di C17 e C27 (gruppo 5) che furono inoculati con ETEC seguiti da *rotavirus*. L'escrezione virale iniziò 12 e 25 h dopo l'infezione con *rotavirus*. Furono trovati titoli massimi 12 e 33 h dopo infezione con *rotavirus*, dopo di ché si registrò un rapido decremento (Figura 1c).

La Figura 2 mostra i titoli infettanti dei *rotavirus* dai tratti intestinali di vitelli (gruppo 2-5). Si trovò che i vitelli del gruppo 2 avevano titoli infettanti la cui media geometrica variava tra $10^{3,7}$ e $10^{5,5}$ $DICT_{50}$/g intestino. Questi valori differivano significativamente ($p<0,05$) dai gruppi 4 e 5. I titoli infettanti medi di vitelli del gruppo 3 variavano tra $10^{4,0}$ e $10^{6,7}$ $DICT_{50}$/g tessuto. I titoli dei gruppi 3 e 4 non differivano significativamente l'uno dall'altro. Comunque nel gruppo 5 comparativamente agli altri gruppi forono trovati titoli infettanti medi significativamente più bassi (tra $10^{2,2}$ e $10^{3,9}$ $DICT_{50}$/g tessuto) e nel gruppo 4 in paragone agli altri gruppi furono trovati titoli infettanti medi significativamente ($p < 0,05$) maggiori (tra $10^{6,2}$ e $10^{7,45}$).

Gli studi istologici e di immunofluorescenza permettono di fare i seguenti commenti:

1. Quantità crescenti di virus furono viste nelle parti laterali dei villi di vitelli infettati simultaneamente comparativamente ai vitelli monoinfettati in cui il virus fu trovato solo nella parte apicale dei villi.

2. Un titolo virale molto più elevato fu rilevato nei macrofagi che attraversano la mucosa dei vitelli con infezione mista comparati ai vitelli monoinfettati.

3. Significativamente più virus fu trovato in linfonodi del piccolo intestino e significativamente più linfociti intraepiteliali furono evidenziati in vitelli con infezione mista.

Discussione

Lo scopo della nostra indagine fu di chiarire il tipo di interazione tra *E. coli* enterotossici e *rotavirus bovino* in vitelli neonati privati di colostro. La diarrea indotta da ETEC nei vitelli è una malattia dipendente dall'età, che si verifica durante i primi giorni di vita solo in seguito ad assunzione di una alta dose di batteri. Quando questa dose è ridotta a 10^7 organismi, non si svilupperà malattia clinica. I *rotavirus bovini* sono poco virulenti (7) e causano solo diarrea lieve e transitoria in vitelli neonati. (Alcuni stipiti isolati in Gran Bretagna e negli Stati Uniti possono essere più virulenti, 18, 25). Comunque, quando *rotavirus* a bassa virulenza e una dose subclinica di ETEC furono somministrati simultaneamente, ne risultò grave malattia, con un più breve periodo d'incubazione ed un periodo prolungato di sintomi diarroici. Inoltre, l'infezione contemporanea con entrambi gli agenti conduce ad una drastica riduzione della dose infettante minima di ETEC che causa diarrea. In più, la mancanza di sintomi clinici e il titolo molto basso di *rotavirus* nel gruppo 5, dove gli ETEC furono seguiti da infezione con *rotavirus* 15-36 h dopo, indica un'interazione sinergica di entrambi gli agenti se sono presenti abbastanza cellule epiteliali infettate con *rotavirus* nel momento in cui l'animale è completamente sensibile alla colonizzazione di ETEC.

Il danno più grave dopo infezioni simultanee indica che o il danno causato da infezione e replicazione di *rotavirus* a bassa virulenza favorisce l'attacco e/o la crescita di ETEC nell'intestino o è un risultato di una più forte azione di tossine batteriche su cellule infette da virus. Inoltre, i titoli di *rotavirus* significativamente maggiori nei tratti intestinali di vitelli con duplice infezione indicano che non si tratta di un'interazione a senso unico.

Tuttavia, alcune questioni rimangono insolute; per esempio, il numero di organismi ETEC presenti in/sulla mucosa intestinale non era più di 10-100 volte maggiore nel vitello ETEC diarroico comparato ai vitelli ETEC asintomatici. Altri fattori, come endotossina batterica, possono anche giocare un ruolo in questo rapporto. Un certo numero di simili osservazioni in infezioni miste virali/batteriche sono state fatte nel tratto respiratorio (2, 8, 16, 26). Dopo infezione primaria virale con *adenovirus, virus parainfluenza* o *herpesvirus bovino 1* e successiva infezione con *Pasteurella haemolytica* si ebbe una malattia

respiratoria più grave paragonata a un'infezione con uno solo dei due agenti. Anche una diminuita capacità del sistema mucociliare e dei macrofagi alveolari diede luogo a una riduzione della minima dose infettante per i batteri in questo sistema.

Le conclusioni di quest'indagine dovrebbero aver conseguenze rispetto alle misure profilattiche verso la diarrea neonatale del vitello. C'è una diffusa opinione che la complessa malattia potrebbe essere curata solo mediante misure igieniche. La riduzione della minima dose infettante per ETEC riportata in questo lavoro porta al quesito di che tipo di altri agenti poco virulenti occasionalmente presenti nell'intestino potrebbe indurre una simile forma grave di malattia mista virale/batterica. Quindi, la vaccinazione della madre sembra essere l'unico strumento per ridurre la mortalità nella diarrea neonatale del vitello (11, 12).

BIBLIOGRAFIA

1) Acres S.D., Laing C.J., Saunders J.R. and Radostis O.M. (1975): Acute undifferentiated neonatal diarrhoea in beef calves: I. Occurrence and distribution of infectious agents. Can. J. Comp. Med., *39*, 116-132.
2) Al-Darraji A.M., Cutlip R.C., Lehmkuhl H.D., Graham D.L., Kluge J.P. and Frank G.H. (1982): Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and Pasteurella haemolytica: Clinical and microbiologic studies. Amer. J. Vet. Res., *43*, 236-240.
3) Bachmann P.A. (1979): Rotavirusnachweis in Faeces: Erfahrungen mit dem Enzyme-linked-Immunosorbent Assay. Zentralbl. Veterinaermed. B., *26*, 836-843.
4) Bachmann P.A. and Hess R.G. (1982): Comparative aspects of pathogenesis and immunity in animals. In: Viral Infections of the Gastrointestinal Tract. pp. 361-398. Tyrell D.A.J. and Kapikian A.S. (eds); Marcel Dekker, New York.
5) Baljer G. and Bachmann P.A. (1980): Nachweis enteropathogener *Escherichia coli*-Staemme und Rotaviren in Kotproben von Kaelbern mit Diarrhoea. Zentralbl. Veterinarmed., *B27*, 608-615.
6) Benfield D.A. and Francis D.H. (1980): Diagnosis of naturally born calf diarrhea associated with coronavirus, rotavirus and *Escherichia coli*, pp. 361-372. In: Proc. III. Int. Symp. Neon. Diarrhea, VIDO, Univ. Saskatschwan.

7) CARPIO M., BELLAMY J.E.C. and BABIUK L.A. (1981): Comparative virulence of different bovine rotavirus isolates. Can. J. Comp. Med., *45*, 38-42.
8) DAVIES D.H., DINGWORTH D.L., HUMPHREYS S. and JOHNSON A.J. (1977): Concurrent infection of lambs with parainfluenza type 3 and *Pasteurella haemolytica*. New Zeal. Vet. J., *25*, 263-265.
9) DEAN A.G., CHING Y.C., WILLIAMS R.G. and HORDEN L.B. (1972): Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhoea in children in Honolulu .J. Inf. Dis., *125*, 407-411.
10) ECHEVERRIA P., RAMIREZ G., BLACKLOW N.R., KSIAZEK T. CUKOR G. and CROSS J.H. (1979): Travelers' diarrhea among U.S. army troops in South Korea. J. Inf. Dis., *139*, 215-219.
11) EICHHORN W., BACHMANN P.A., BALJER G., PLANK P. and SCHNEIDER P. (1982): Vakzinierung hochtraechtiger Rinder mit einem kombinierten *Rotavirus/E. coli* K99⁻ Impfstoff zur Prophylaxe von Durchfallerkrankungen bei neugeborenen Kaelbern. Tierartzl. Umschau, *37*, 599-604.
12) FAHEY K.J., SNODGRASS D.R., CAMPBELL I., DAWSON A. McL. and BURRELS C. (1981): IgG1 antibody in milk protects lambs against *rotavirus* diarrhea. Vet. Immunol. Immunopathol., *2*, 27-33.
13) GOUET P., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., RIOU Y. and SCHERRER R. (1978): The experimental production of diarrhoea in colostrum deprived axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic *E. coli*, *rotavirus, coronavirus* and in a combined infection of *rotavirus* and *Escherichia coli*. Ann. Rech. Vet., *9*, 433-440.
14) GUINÉE P.A.M., JANSEN W.H. and AGTERBERG C.M. (1976): Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin, a comparative study. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, *243*, 245-257.
15) HESS R.G., BACHMANN P.A., BALJER G., MAYR A., POSPISCHIL A. and SCHMID G. (1983): Synergism in experimental mixed infections of newborn colostrum-deprived calves with bovine *rotavirus* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). (In corso di pubblicazione).
16) JERICHO K.W.F. and LANGFORD E.V. (1978): Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine *herpesvirus* 1 and *Pasteurella haemolytica*. Can. J. Comp. Med., *42*, 269-277.
17) LOGAN E.F., PEARSON G.R. and MCNULTY M.S. (1979): Quantitative observations on experimental reo-like virus (*rotavirus*) infection in colostrum-deprived calves. Vet. Rec., *104*, 206-209.
18) MEBUS C.A., UNDERDAHL N.R. RHODES M.B. and TWIEHAUS J.J. (1969): Calf diarrhea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. Univ. Nebr. Res. Bull., *233*, 1-16.
19) MOON H.W., MCCLURKIN A.W., ISAACSON R.E., POHLENZ J. SKARTVEDT S.M., GILLETTE K.G. and BAETY A.L. (1978): Pathogenic re-

lationships of *rotavirus, Escherichia coli* and other agents in mixed infections in calves. J. Amer. Vet. Med. Ass., *173*, 577-583.
20) MORIN M., LARIVIERE S. and LALLIER R. (1976): Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhoea. Can. J. Comp. Med., *40*, 228-240.
21) RUNNELS P.L., MOON H.W., WHIPP S.C., MATTHEWES P.J. and WOODE G.N. (1980): Interaction of *rotavirus* and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in gnotobiotic calves, pp. 343-358, Prod. III. Symp. Neon. Diarrhea, VIDO, UNIVERS. Saskatchewan.
22) SMITH H.W. and HALL S. (1967): Observations by the ligated intestine segment and oral inoculation methods on *E. coli* infection in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Pathol. Bacteriol., *93*, 499-529.
23) SNODGRASS D.R. SMITH M.L. and F.L. KRAUTIL (1982): Interaction of *rotavirus* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in conventionally-reared dairy calves. Vet. Microbiol., *7*, 51-60.
24) TZIPORI S.R., MAKIN T.J., SMITH M.L. and KRAUTIL F.L. (1981): Clinical manifestations of diarrhoea in calves infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and *rotavirus*. J. Clin. Microbiol., *13*, 1011-1016.
25) WOODE G.N. (1976): Pathogenic *rotaviruses* isolated from pigs and calves. In: Diarrhoea in Childhood. Ciba Foundation Symp. No. 42, Elsevier/Excerpta Medica, Amsterdam. p. 251.
26) YATES W.D.G., JERICHO K.I.W. and DOIGE C.E. (1983): Effect of bacterial dose on pneumonia induced by aerosol exposure of calves to bovine *herpesvirus* 1 and *Pasteurella haemolytica*. Am. J. Vet. Res., *44*, 238-243.

TAB. 1 - AGENTI INFETTIVI CHE CAUSANO DIARREA IN VITELLI NEONATI

GRUPPO	GENERE
	Rotavirus (? sierotipi)
	Coronavirus (? sierotipi)
	Parvovirus bovino
Virus	*Calicivirus*
	Astrovirus
	Adenovirus
	Virus della Diarrea Virale Bovina (BVD)
	Chlamydia
	E. coli enterotossici (K99, F41)
Batteri	*Salmonella* spp.
	Campylobacter fetus, spp. *jejuni*
Protozoi	*Cryptosporidia*
	Coccidia

TAB. 2 - NUMERO ESPRESSO IN LOG 10 DELLE UNITÀ FORMANTI COLONIA (UFC) DI *ESCHERICHIA COLI* (K99+, ST+) E RISPOSTA CLINICA IN DIVERSI TRATTI INTESTINALI DI VITELLI DOPO INOCULAZIONE PER VIA ORALE E DI VITELLI CONTROLLO NON INOCULATI

Gruppo N°	Vitello infettato con	Diarrea	N° di ETEC per 5 cm di mucosa di				Trovati anche
			Digiuno			Colon	
			Pross.	Med.	Dist.		
1	C11, ETEC 10^{10}	+++[c]	5,4	8,2	7,9	7,2	—
	C16, ETEC 10^{7}	no	7,0	6,5	6,2	6,2	*S. liquefaciens*[a]
	C50, ETEC 10^{7}	no	—	3,1	3,2	6,4	*S. liquefaciens*/ non-ETEC
6	C12, non-inoculato	no	—	—	—	—	non-ETEC[a]
	C42, non-inoculato	no	—	—	—	—	non-ETEC[b]

[a] appross. 10^2 - 10^3 UFC

[b] appross. 10^2 - 10^4 UFC

[c] +++: diarrea acquosa

TAB. 3 - DATI CLINICI DI VITELLI DOPO INFEZIONE PER VIA ORALE CON QUATTRO DIVERSI CEPPI DI *ROTAVIRUS BOVINO* (GRUPPO 2)

Vitello N°	Ceppo di *rotavirus*	Tempo di incubazione (h)	Diarrea [c]	Tempo di necroscopia [a]	Trovati [b] anche
C-18	Monaco	—	No	20	Non-ETEC
C-14	V 1158	38	++	40	Non-ETEC
C-25		—	No	24	Aerobi formanti spore
C-29	Monaco V 28	24	+	34	Non-ETEC/ *S. liquefaciens*
C-28		24	++	72	Non-ETEC
C-40	Monaco V 1125	35	++	95	Non-ETEC
C-52	RO-4	24	++	116	Non-ETEC/ *Enterobacter*

[a] post infezione

[b] presenti tra 10 e 4×10^4 UFC

[c] + = feci molli

++ = diarrea lieve

TAB. 4 - DATI CLINICI DI VITELLI DOPO INFEZIONE PER VIA ORALE CON DOSI SUBCLINICHE DI *ROTAVIRUS* (CEPPO MONACO V28/78) E DEL CEPPO ENTEROTOSSICO *ESCHERICHIA COLI* (K99+, ST+) B41 SECONDO DIVERSI SCHEMI

Gruppo n°	Vitello n°	Regime di Infezione 1. Inoc. [a]	2. Inoc. [a]	Tempo di incubazione [b]	Diarrea [c]	Tempo di necroscopia [b]
3	C-22	7 *rotavirus*	19 ETEC	24	+++	35
	C-23	4 *rotavirus*	18 ETEC	21	++	46
4	C-26	3 *rotavirus*	3 ETEC	19	+++	24
	C-36	18 *rotavirus*	18 ETEC	24	++++	31
	C-51	18 *rotavirus*	18 ETEC	24	++++	57
	C-53	22 *rotavirus*	22 ETEC	24	++++	105
5	C-17	16 ETEC	52 *rotavirus*	—	no	76
	C-27	5 ETEC	20 *rotavirus*	40	+	69

[a] h post partum

[b] h dopo prima infezione

[c] + feci molli +++ diarrea acquosa

++ diarrea lieve ++++ disidratazione

TAB 5 - NUMERO ESPRESSO IN LOG 10 DELLE UNITÀ FORMANTI COLONIA (UFC) DI *ESCHERICHIA COLI* (K99+, ST+) ENTEROTOSSICO IN DIVERSI TRATTI INTESTINALI DI VITELLI DOPO INFEZIONE PER VIA ORALE CON DOSI SUBCLINICHE DEL CEPPO ETEC B41 E DI *ROTAVIRUS* (CEPPO MONACO V28/78) SECONDO DIVERSI SCHEMI

Gruppo	Vitello	Ore fra l'insorgenza di diarrea e la necroscopia	Numero di ETEC per 5 cm di mucosa di					Trovati anche
			digiuno			Ileo	Colon	
			prossimale	medio	distale			
3	C-22	11	7,0	7,4	7,6	n.f.[b]	n.f.	—
	C-23	25	5,0	5,3	5,8	n.f.	6,5	—
4	C-26	5	6,0	6,0	7,5	7,2	5,0	—
	C-36	7	3,5	4,4	6,0	7,4	6,7	non-ETEC [c]
	C-51	33	4,0	5,3	8,0	6,1	5,2	*S. liquefaciens* [c]
	C 53	81	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	non-ETEC [c]
5	C-17	—[a]	4,5	4,8	4,6	n.d.	4,6	—
	C-27	30	3,2	3,3	3,0	5,2	4,2	—

[a] necroscopia a 92 h post partum

[b] non fatto

[c] appross. 10^3 - 10^4 UFC

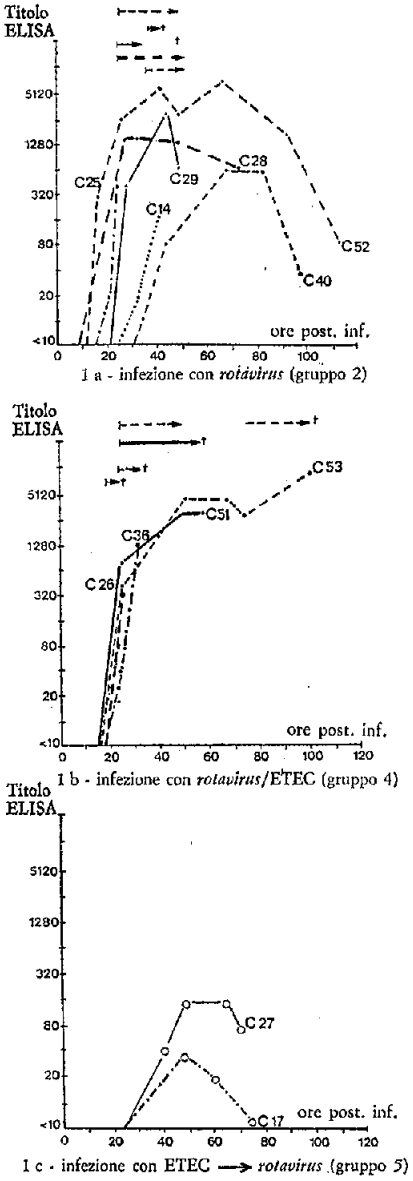


FIG. 1 - Comparazione dell'escrezione di antigene *rotavirus* nelle feci di sei vitelli monoinfettati con *rotavirus* (a), di cinque vitelli infettati con *rotavirus*/ETEC (b) e di due vitelli nei quali l'inoculazione di ETEC fu seguita da infezione con *rotavirus* (c). (Durata della diarrea e tempo di necroscopia sono indicati nella parte superiore della Fig. 1a e della Fig. 1b).

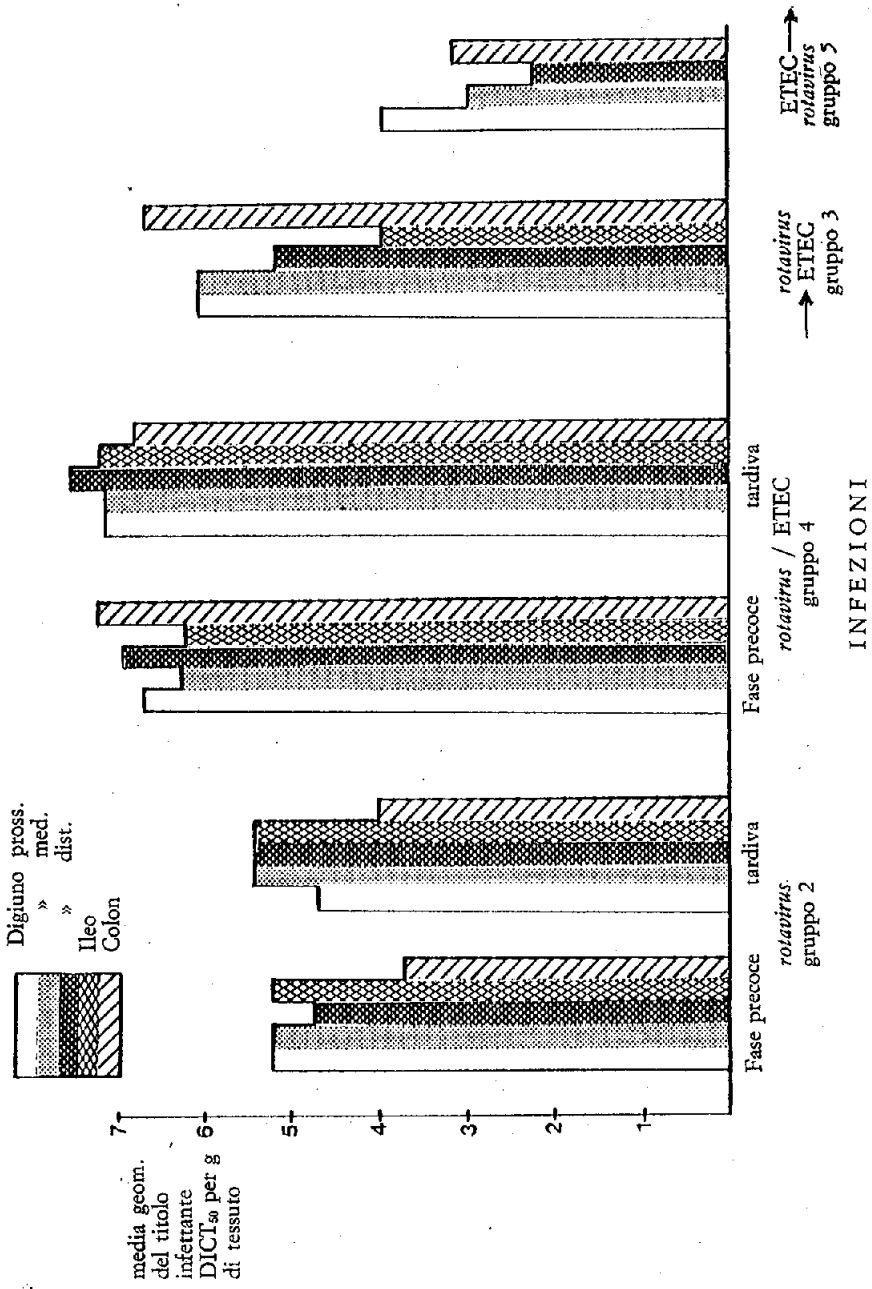


FIG. 2 - Infettività del *rotavirus* di tratti intestinali (digiuno prossimale, medio e distale, ileo, colon) di vitelli dopo infezione per via orale con *rotavirus* (gruppo 2), ETEC/*rotavirus* (gruppo 4), *rotavirus* seguito da ETEC (gruppo 3) e ETEC seguito da *rotavirus* (gruppo 5) (media geometrica dei titoli infettanti $DICT_{50}$/g tessuto).

DISCUSSIONE PARTE PRIMA

G. Poli

Nel corso delle varie relazioni si è più volte ribadito che il pH dello stomaco del vitello neonato è attorno a valori neutri. Io mi sono un poco documentato sull'argomento e devo dire che sebbene venga più volte ripetuto questo concetto in realtà non vengono mai indicati i relativi dati bibliografici.

I trattati di fisiologia dei ruminanti, che ho consultato, riportano valori attorno a pH 2.5-3, mentre non si parla mai di neutralità. Questa mia osservazione viene supportata dal fatto che per causare l'enterite sono necessari, nel vitello, milioni o miliardi di *E. coli* enterotossigeni, mentre gli esperimenti condotti nell'uomo dimostrano che sono sufficienti poche migliaia di microrganismi adesivi dello stesso tipo per innescare la forma diarroica, purché si faccia loro superare la barriera acida dello stomaco.

Pertanto, penso che anche nel vitello sia necessario, per indurre la diarrea, far superare ai coli la barriera gastrica, la cui acidità, a mio parere, gioca un ruolo primario verosimilmente anche nelle primissime ore della vita dell'animale.

P.A.M. Guinée

In uno dei nostri esperimenti 2 suinetti privati del colostro morirono in 24 ore a seguito della somministrazione per via orale di una piccola quantità di batteri enteropatogeni. Il pH dello stomaco di tali animali aveva un valore di 7.0. La situazione cambia quando si usano soggetti che non sono stati privati del colostro.

G. Ballarini

Vorrei precisare che nell'animale neonato diversi meccanismi re-

golano il pH gastrico. Esistono inoltre due situazioni diverse a secondo che l'animale ha assunto o no colostro. Anzitutto ricordiamo che l'acidità prodotta dall'acido cloridrico è scarsissima e praticamente assente nel neonato e pertanto nei soggetti che non hanno assunto il colostro il pH è 7.0. Negli animali che assumono il colostro e successivamente il latte, il lattosio è in parte fermentato con formazione di acido lattico per cui nello stomaco vi è un pH acido. Tale acidità è ripartita diversamente nello stomaco, perché molti batteri lattici aderiscono alla mucosa; pertanto si ha uno «strato» di maggiore livello della mucosa che non all'interno del contenuto gastrico. Questo spiega le differenze che si possono avere tra vitelli senza colostro e con pH gastrico tendente alla acidità.

D. Fenizia

Spesso le micotossine, contaminando i mangimi, sono la causa della morte di animali nel periodo di svezzamento. Erroneamente, i laboratori sono portati a considerare i colibacilli quali unici responsabili della morte e a sottovalutare l'azione scatenante delle micotossine.

G. Baljer

Non abbiamo riscontri chiari sul ruolo delle micotossine nell'azione dei ceppi ETEC. La sola cosa che sappiamo è che le micotossine sono immunosoppressive; in questo senso possiamo pensare ad un effetto sinergico delle micotossine.

Un elevato contenuto di micotossine è conseguenza di una alta contaminazione dell'alimento stesso. In tali condizioni è molto probabile che l'alimento contenga molti altri agenti che possono scatenare una diarrea.

P. Acone

Considerata la diversa presenza di fattori di aderenza nelle varie specie animali volevo chiedere se oltre al fattore K99 che è comune

ai vitelli e agli agnelli, sono stati evidenziati altri tipi di adesine negli agnelli ed in particolare nei caprini, animali in cui si osservano spesso malattie neonatali.

P.A.M. Guinée

Per quanto ne so, sono gli stessi associati alla malattia nel vitello, cioè il K99.

A. Zecconi

In riferimento a quello che ha detto il Prof. Galassi all'inizio cioè alla modulazione della zona microbica intestinale, volevo chiedere che importanza ha questa flora microbica intestinale, soprattutto fermenti lattici, nell'impedire l'adesione del coli alla parete intestinale. Che interferenze hanno questi fermenti nei confronti della patogenicità dell'*E. coli*?

A. Nigrelli

Effettivamente diversi autori indicano che la somministrazione di flora lattica, lattobacilli e streptococchi, è competitiva alla colonizzazione di *E. coli* enterotossici nell'intestino dei suini. Da un punto di vista concettuale essa sembra rivestire notevole importanza. In un recente seminario organizzato dalla CBB sull'argomento, alcuni autori francesi che hanno sperimentato questo tipo di profilassi non sono stati in grado di presentare risultati di ordine pratico significativi. Molto probabilmente la via è valida, ma sia la quantità che soprattutto la qualità della flora lattica da somministrare deve essere ancora ben definita. Ricordiamo che in terapia umana le forme di enteriti da salmonella non vengono più combattute con gli antibiotici, ma ci si orienta sulla somministrazione di fermenti lattici e di yogurt a volontà. Penso che questa sia la via giusta. In veterinaria tuttavia sorge un problema, quello della stabilità. Ho visto fermenti lattici stoccati in sacchi di mangime per lunghi periodi. Dopo questo stoccaggio

c'è da aspettarsi che i fermenti lattici non siano più vitali. È necessario orientarsi su prodotti liofilizzati, il che chiaramente presuppone un costo piuttosto elevato. Non ho esperienza personale in questo tipo di intervento, ma da quanto so dalla letteratura ritengo che finora risultati significativi non siano stati raggiunti.

G. Poli

Ritengo che sia molto importante il discorso che è stato fatto, relativo cioè a una eventuale utilizzazione di idonei stipiti batterici, somministrati per via orale, con la finalità di antagonizzare le azioni dei patogeni opportunisti. Tuttavia, certi termini del discorso non sono, secondo me, corretti. La flora intestinale si è stabilizzata in una determinata specie animale nel corso di secoli e quindi è impensabile che introducendo dei bacilli, ad esempio lattici, questi possano colonizzare l'intestino utilizzando quei recettori che per un mutuo rapporto tra flora microbica autoctona e organismo ospite sono andati appunto selezionandosi nel tempo.

A questo proposito si può ricordare che somministrando sino a 1 kg di yogurt al giorno all'uomo, non un solo lattobacillo si impianta a livello intestinale per il semplice fatto che tali batteri non posseggono fattori di adesione per i recettori intestinali.

Verosimilmente il meccanismo dell'azione benefica esplicata talvolta dai lattobacilli, nel corso di patologia enterica da *E. coli*, non è tanto basato su fenomeni di competizione a livello di recettore, quanto sul fatto che *E. coli* trova un ambiente inadatto sulla sua replicazione quando con il lattobacillo acidifichiamo l'ambiente intestinale.

Fatte queste premesse si può capire perché spesso la somministrazione di lattobacilli non è in grado di prevenire la patologia in oggetto.

G. Ballarini

Sono completamente d'accordo che bisogna somministrare fermenti vivi, ma a questo proposito sono necessarie alcune cautele circa le

titolazioni fatte su prodotti invecchiati. Se infatti un prodotto invecchiato viene somministrato in quantità calcolata sulla base dei batteri viventi in quel momento vi è la somministrazione di una grande quantità di lattasi, la quale può dare inconvenienti. Si spiega così la diarrea che può comparire con la somministrazione di preparazioni invecchiate di batteri lattici. Il problema della stabilizzazione è pertanto importante.

Sono d'accordo con Poli che non esiste una competizione ricettoriale. Esiste però una certa competizione «numerica» tra i batteri. Infatti se somministriamo un certo numero di batteri lattici all'inizio della vita, quando l'intestino è «microbiologicamente vuoto», avremo risultati strettamente positivi. Se invece somministriamo tali fermenti quando l'intestino ha già una sua flora microbica più o meno costituita, essi serviranno a ben poco, o praticamente a nulla.

Bisogna pertanto scegliere i momenti adatti di somministrazione, ad esempio l'inizio della vita, le prime 12-24 ore di vita, lo stress da svezzamento, e così via. Mano mano che l'animale va avanti con l'età, tanto meno è capace di recepire l'intervento, perché ha una flora microbica intestinale sempre più stabile. Questo spiega perché i batteri lattici siano dei mezzi non facili da impiegare e bisogna saperli somministrare con notevole accuratezza. Un'altra situazione di «vuoto microbiologico» intestinale si ha dopo i trattamenti antibiotici.

Ultima considerazione. Sarei cauto nel considerare l'impiego di fermenti lattici antibiotico-resistenti, fino a quando non si dimostra di che tipo di antibiotico-resistenza si tratta: se cromosomica o plasmidica. Non vorrei introdurre tramite i plasmidi dei fermenti lattici, nuovo cavallo di Troia, una antibiotico-resistenza trasmissibile.

G. Gagliardi

È stato detto che la patogenicità del coli deriva dalla combinazione della adesività con la tossicità. Abbiamo visto dagli schemi del Prof. Guinée che ci sono ceppi i quali hanno adesività, ma non hanno

tossicità e viceversa. Volevo allora chiedere: questi ceppi con adesività, senza tossicità e viceversa, che potenziale patogeno hanno?

P.A.M. Guinée

I ceppi privi del K88 sono presenti di solito allo svezzamento mentre penso, pur non avendo alcuna esperienza personale, che non si riscontrino tali ceppi nel suinetto neonato. In esso si ritrovano di solito ceppi in possesso del K88.

P. Porter

L'attività anticorpale di un organismo animale riveste particolare significato in relazione alla espressione del K88. È risaputo e provato che gli anticorpi mucosali, cioè del colostro e della parete intestinale, hanno la capacità di destabilizzare l'*E. coli* fino a fargli perdere il plasmide responsabile dell'espressione del K88. È pertanto possibile, sia in vitro che in vivo, indurre in un coli la perdita dell'antigene K88, pur preservando in esso la capacità di esprimere l'enterotossina. Questo nuovo batterio è in grado di ostacolare i patogeni dotati di K88 e di enterotossina. L'ospite pertanto è in grado di giocare un ruolo nei riguardi delle modalità d'azione del patogeno.

P. Cancellotti

Volevo chiedere al Dr. Hess, se nei suoi esperimenti ha lavorato in un ambiente sterile oppure in ambiente dove erano presenti altri agenti infettanti e se oltre all'azione immunodepressiva o comunque all'azione patogena del coli e dei rotavirus ha constatato nella sua esperienza, anche la moltiplicazione di un qualche altro agente e mi riferisco soprattutto al virus BVD.

Una seconda domanda: il Dr. Hess ha parlato di profilassi delle enteriti da rotavirus e ovviamente delle enteriti in generale; volevo

conoscere meglio la sua opinione riguardo ai vaccini vivi o inattivati somministrati alla madre.

G. Hess

Per quanto riguarda la prima domanda, le confermo che non abbiamo operato in condizioni di gnotobiosi. Questa condizione l'abbiamo scartata di proposito poiché essa crea altri problemi, che riguardano ad esempio i meccanismi patogenetici e le reazioni dell'ospite. Nella nostra relazione abbiamo indicato quali microrganismi erano presenti nell'intestino, per esempio *E. coli* non ETEC, riscontrato ad una concentrazione di 10^2 - 10^4 nei differenti segmenti intestinali dei nostri 2 vitelli. Per quanto riguarda la 2ª domanda, si dovrebbero usare vaccini inattivati. Prove di campo sono in corso in Germania e nella maggior parte dei Paesi europei, con Rotavirus in forma inattivata, usati per la vaccinazione della madre. In tutte le bovine che sono state sensibilizzate dai Rotavirus, bisogna eseguire un richiamo per via parenterale, per innalzare il titolo degli anticorpi. Nel suino si ha una situazione del tutto differente poiché si devono stimolare le cellule della memoria presenti nell'intestino, sistema che nei vitelli non è invece ben sviluppato.

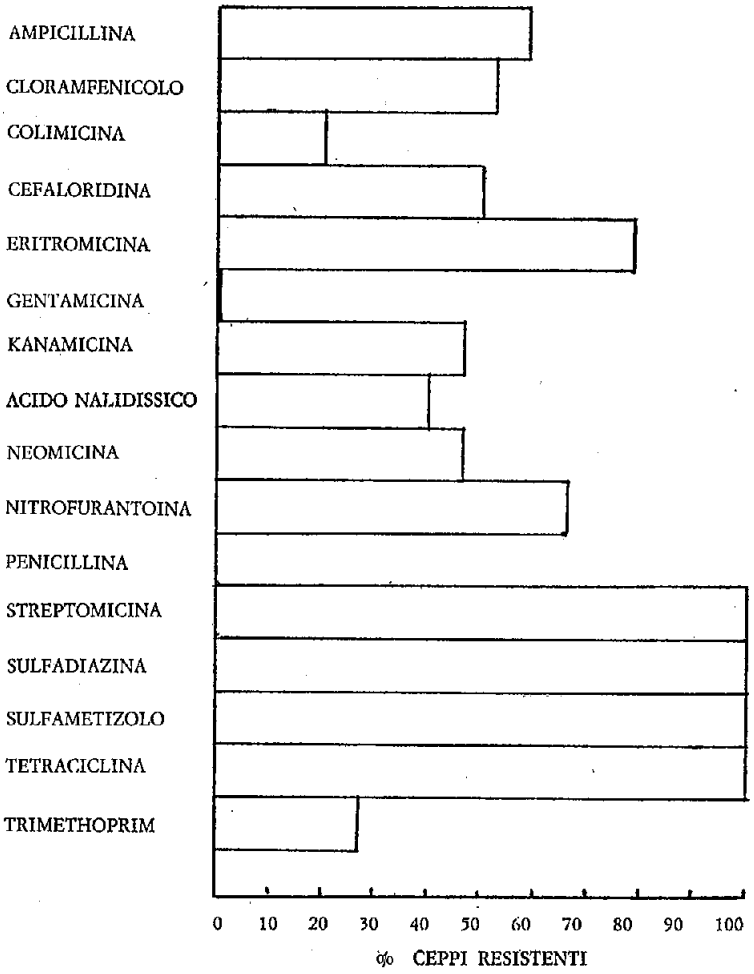
G. Panina

Vorrei chiedere al Dr. Nigrelli se sono state condotte prove di sensibilità agli antibiotici sui ceppi ETEC pervenuti al suo laboratorio.

A. Nigrelli

Su un certo numero di ceppi ETEC pervenuti al nostro laboratorio sono stati eseguiti gli antibiogrammi. I risultati sono esposti nella tabella 1.

TAB. 1 - ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN 30 CEPPI ETEC ISOLATI DA SUINI NEONATI AFFETTI DA ENTERITE



A. Zecconi

Volevo segnalare che, per quanto riguarda gli isolamenti di *E. coli* nella zona attorno a Milano la gentamicina non fornisce una risposta molto soddisfacente. Anzi, attualmente rispondono meglio le cefalosporine e talvolta il CAF. Questi risultati potrebbero essere legati alla zona, anche pensando ad una antibiotico-resistenza plasmidica, ma altri fattori potrebbero essere coinvolti.

G. Conedera

Desideravo sapere se i ceppi saggiati da Nigrelli con l'antibiogramma erano ceppi enterotossici o no. In questo caso il problema è risolto perché questi ceppi hanno un'antibiotico-resistenza ben specifica. Durante una mia recente visita in Olanda, ho trovato accordo sull'efficacia della polimixina B ed anche della colimicina. Comunque ritengo molto importante definire se si tratti di ceppi enterotossici, in quanto esiste una controversia per quanto riguarda la possibilità che i plasmidi di resistenza agli antibiotici si trasmettano con quelli che codificano i fattori di adesività e le enterotossine.

G. Gagliardi

Nel giro di meno 24 ore l'intestino viene colonizzato dal coli normale. Quando il coli dotato di adesina entra nell'intestino già colonizzato dal coli normale, iniziano processi competitivi oppure il ceppo dotato di adesina aderisce comunque alla mucosa?

P.A.M. Guinée

Abbiamo eseguito un numero limitato di esperimenti, usando suinetti appena nati, in cui non c'era stata ancora colonizzazione da parte di E. coli normali. Per quanto ne so, non c'è effetto reciproco in vitro tra gli *E. coli* dovuto alle colicine. So che le colicine sono inattivate dagli enzimi intestinali, ma c'è quasi sicuramente un altro effetto inibente su, probabilmente, tutti i ceppi di *E. coli* da parte della flora anaerobica. La flora anaerobica è però distrutta assai facil-

mente da qualsiasi antibiotico si usi. La minima dose infettante può così scendere da 10^5 forse a 10 microrganismi, come dimostrato da esperimenti eseguiti negli U.S.A.

G. Baljer

Non penso sia corretto dire che *E. coli* normali sono presenti nelle prime 20 ore di vita e quindi si insediano gli *E. coli* enteropatogeni. L'infezione da *E. coli* enteropatogeni può essere riscontrata anche una o due ore dopo la nascita e pertanto si può avere infezione anche entro le prime ore di vita. Inoltre *E. coli* normali pervengono al colon senza attaccarsi al piccolo intestino e senza che si verifichi competizione tra ceppi normali e ceppi enteropatogeni.

G. Poli

Qual è il significato diagnostico da dare all'isolamento di *E. coli* quando l'animale viene a morte e successivamente è portato all'esame? Pochi sono in Italia i laboratori che possono fare quello che si fa a Brescia e a Padova dove si giunge alla identificazione dei ceppi adesivi ed enterotossigeni e pertanto è possibile associare, con una certa sicurezza, il ceppo di *E. coli* isolato alla forma morbosa. Ora, in mancanza di tale identificazione, quale significato effettivamente dobbiamo dare ai numerosissimi ceppi di *E. coli* che possono invadere un organismo o dopo la sua morte o a seguito dell'intervento di un virus a replicazione intestinale che ne altera la permeabilità? È evidente che in tali casi è facile isolare il coli perché esso è il più rappresentato nell'intestino.

Quali possono perciò essere i rilievi più significativi, concomitanti ad un isolamento di un *E. coli* generico, per poter dire che realmente abbiamo isolato l'agente eziologico?

A. Nigrelli

Secondo un mio criterio personale, ma basandomi anche sui dati

della letteratura, la forma setticemica viene diagnosticata esclusivamente in caso di isolamento dal sistema nervoso centrale e dal midollo osseo; quella enterotossica con la dimostrazione di antigeni adesivi, secondo le metodiche che ha illustrato il Dr. Guinée precedentemente, in ceppi isolati da tratti intestinali o dalla feci. Per quanto riguarda le forme enterotossiemiche in cui non abbiamo la dimostrazione di un enterotossina specifica, in cui c'è scarsa frequenza di fattori adesivi, ci si basa sulla statistica nostra e di altri autori che indica un'associazione tra determinati ceppi ed enterotossiemia. I due ceppi predominantti in questi casi sono O139 : K82 e O141 : (K85 ab) o O144 : (K85 ac). Quindi in pratica è l'isolamento o dal piccolo intestino o dai linfonodi meseraici di ceppi emolitici che rispondono a questi due sieri che permette una diagnosi affidabile di enterotossiemia da coli, in animali con un quadro anatomo-patologico corrispondente. Aggiungo che a volte nel vitello venuto a morte non per setticemia ma per tossiemia si osservano localizzazioni di *E. coli* a livello polmonare, renale e splenico, mentre a livello di SNC e del midollo osseo non si isola tale germe. Ora, dal momento che anche nelle forme setticemiche la causa ultima della morte è l'azione dell'endotossina sui tessuti, un'azione cioè di lisi cellulare a carico dei tessuti in cui i germi si localizzano, potrebbero essere sufficienti anche le localizzazioni a livello polmonare, renale per provocare per shock la morte del vitello, senza arrivare ad una localizzazione a livello del SNC o del midollo osseo. È questa un'osservazione che va confermata controllando se i ceppi isolati da questi organi appartengono allo stesso ceppo e se a livello del piccolo intestino è presente un numero di *E. coli* superiore a quello normale. Naturalmente la validità di questo controllo è subordinata al fatto che l'animale sia stato controllato appena morto.

G. Baljer

Penso che non possiamo dimenticare che, prima di poter caratterizzare gli *E. coli*, li dobbiamo isolare. Nella nostra esperienza, il materiale meno adatto è costituito dagli animali morti. Dopo 2 o 3 ore dalla morte si verifica una diffusione degli *E. coli* normali dal colon in tutto l'organismo ed è allora molto difficile ritrovare gli *E. coli* enterotossici. Il materiale migliore è costituito da feci fresche, prele-

vate da uno o due giorni dopo l'esordio della diarrea, allorquando vi è un'eliminazione assai notevole di *E. coli* enterotossici. Anche gli animali in vita ammalati sono adatti alle ricerche; da questi, una volta soppressi, si asporta rapidamente il materiale che interessa, ad esempio l'intestino.

A. Nigrelli

I ceppi enterotossici vanno ricercati o nell'animale vivo soppresso oppure nelle feci. Ciò non è applicabile nelle forme di enterotossiemia o setticemia perché l'animale muore improvvisamente ed in questo caso il prelievo non può essere fatto che sul cadavere e quindi qui si deve parlare, direi, di diagnosi presuntiva.

G. Ballarini

Mi sembra che nell'ambito delle problematiche di cui stiamo discutendo, si vadano delineando due differenti aspetti: quello propriamente scientifico, sperimentale delle coli-bacillosi come è stato fin'ora, e l'altro che corrisponde alla situazione pratica in cui si vengono a trovare i veterinari. Collegandomi alla relazione del Dr. Hess vorrei ricordare quanto avviene nelle infezioni virali dei vitelli, soprattutto da BVD. Mi riferisco alla lunga «coda» epidemiologica, nella quale la patologia iniziale da BVD è sostituita da quella da coli-bacilli, i quali provocano lesioni interne legate al fatto che gli animali, a causa dell'infezione da BVD non sono più «normali». Qui sarebbe utile e importante una più precisa identificazione di questi coli-bacilli di «complicazione». Una situazione analoga compare nella rotavirosi e nella TGE dei suinetti, soprattutto oltre i 15 giorni dall'inizio della fenomenologia clinica di allevamento. Nella prima quindicina si osserva una TGE pura, successivamente è complicata da coli. Vi sono poi forme come la cosiddetta pseudo-TGE, nella quale la componente colibacillare si prolunga per mesi, talvolta con andamento ciclico nell'ambito dell'allevamento. Tutte queste situazioni sarebbero da esaminare in dettaglio per vedere quali coli-bacilli sono presenti e stabilire che significato dare all'isolamento di un coli-bacillo in un focolaio in cui già è stata identificata un'altra infezione lesiva dell'intestino.

A. Nigrelli

Ritengo che il Prof. Ballarini abbia richiamato una realtà molto importante, quella dell'associazione per esempio tra BVD ed *E. coli.* Il BVD se non vado errato, svolge anche un'azione immunodepressiva e quindi favorisce l'instaurarsi della forma setticemica ed interessante è indubbiamente verificare quali sono i ceppi di *E. coli* implicati, il che rientra nei nostri programmi. Il Prof. Ballarini ha parlato di diarrea della seconda settimana. Noi abbiamo osservato nei suinetti focolai di diarrea che compariva all'età di 7-8 giorni, ad andamento enzootico, con mortalità scarsissima, 1-2%, che si prolungava fino allo svezzamento, in cui non venivano isolati ceppi enterotossici. Tale diarrea era associata alla presenza di rotavirus, evidenziati da noi sia con il microscopio elettronico che con l'ELISA.

PARTE SECONDA

P.J. Davis, J.W. Chidlow, W.D. Allen, J.A. Blades, Margaret A. Linggood e P. Porter *

IMMUNOPROFILASSI DELLE INFEZIONI DA E. COLI NEI SUINETTI MEDIANTE VACCINI SOMMINISTRATI CON L'ALIMENTO

Importanza delle immunoglobuline legate alla mucosa

Un intestino sano e ben alimentato è a prima vista un enigma. Per corrispondere al suo compito di estrazione di tutti i principi nutritivi essenziali dalla dieta dell'animale, deve mantenere un ambiente, che attrae particolarmente un'ampia serie di microrganismi opportunisti ed è loro adatto. Allo stesso tempo è per lui assolutamente essenziale riconoscere ed escludere qualsiasi microrganismo dannoso che abbia accesso a questa utopia batterica, senza impedire le funzioni basilari della digestione e dell'assorbimento. Tuttavia, per mantenere un'adeguata fornitura di sostanze grezze, l'intestino deve costantemente aprirsi a grandi quantità di alimento fresco proveniente dall'esterno; ciò, naturalmente, arreca problemi di ulteriore contaminazione microbica dall'ambiente.

La situazione è ulteriormente complicata dai problemi dell'assorbimento. Evidentemente, la mucosa deve aprirsi a moltissime molecole provenienti dal lume, ma allo stesso tempo deve riconoscere ed eliminare qualsiasi molecola che la danneggi, com'è il caso delle enterotossine ecc. (Moon, 1974). Anche questo compito è più complesso di quanto non sembri a prima vista, poiché anche componenti apparentemente innocui della dieta possono risultare dannosi se assorbiti intatti attraverso l'epitelio della mucosa (Barrat, Strachan e Porter, 1978; Barrat e Porter, 1979; Walker, 1981). In questo caso, il problema è che le difese immunitarie sistemiche siano bilanciate, pron-

* Immunology Department, Unilever Research, Colworth House, Sharnbrook, Bedfordshire, U.K.

te ad eliminare con decisione qualsiasi cosa riconoscibile come «estranea», che abbia accesso all'organismo. Questi meccanismi di rigetto si scatenano non solo su microrganismi interi, bensì su qualsiasi molecola «estranea» o anche frammenti di molecole «estranee», che possono essere riconosciuti. Se tali molecole o frammenti di molecole sono assorbiti dall'alimento attraverso la mucosa, possono scatenare molte reazioni dannose, che vanno dall'anafilassi violenta all'infiammazione cronica dell'intestino, col suo corredo di appiattimento dei villi, edema, diarrea e malassorbimento.

La natura ha fatto fronte a questi problemi munendo l'intestino di un raffinato sistema di riconoscimento e di eliminazione specifica, basato principalmente sull'immunoglobulina secretoria A (IgAS). Questo sistema funziona producendo anticorpi IgAS contro qualsiasi componente «estranea» che penetri regolarmente attraverso l'epitelio della mucosa (rassegna di Bieneenstock e Befus, 1980). Può anche compiere mosse preliminari, producendo anticorpi contro antigeni presenti nel lume (indipendentemente dalla loro capacità di attraversare la mucosa intatta), per mezzo dello speciale dispositivo di raccolta e di risposta, racchiuso nelle placche del Peyer (Owen, 1977).

Una volta che il sistema immunitario secretorio è stato attivato, gli anticorpi IgAS, che sono prodotti da gruppi di plasmacellule nella Lamina Propria, sono dislocati nel lume intestinale. Essi raggiungono il lume o direttamente, mediante trasporto attivo attraverso l'epitelio intestinale (Allen, Smith e Porter, 1973; Brandtzaeg, 1974), o indirettamente, attraverso il fegato e la bile (Reynolds e coll., 1980; Hall e Andrew, 1980).

Il modo in cui la IgAS è attrezzata a svolgere il proprio compito specializzato e a operare nell'ambiente ostile del lume intestinale è degno di nota. Gli anticorpi IgAS hanno le caratteristiche di riconoscimento specifico di tutte le classi anticorpali, ma non attivano il complemento, non rafforzano la fagocitosi, né in qualsiasi altro modo scatenano o promuovono reazioni infiammatorie (Heremans, 1974). Antigeni assorbiti, complessati con IgA, hanno una tendenza a determinare assenza di reattività sistemica (cioè tolleranza), fenomeno di grande valore nella prevenzione delle allergie di origine dietetica (Andre e coll., 1975; Peppard e coll., 1981). Nelle secrezioni esterne tali anticorpi sono corredati di un'importante proteina accessoria (chiamata

Componente Secretoria, o CS), che sembra avere un ruolo importante nel loro trasporto attivo attraverso gli enterociti e gli epatociti (Bradtzaeg, 1974; Fisher e coll., 1979). Questa associazione con la CS fornisce alla IgA la resistenza alla degradazione proteolitica (Underdown e Dorrington, 1974; Lindh, 1975) e la capacità di legarsi alla mucina apicale (Porter, Noakes e Allen, 1972; Heremans, 1974); aspetti questi di particolare valore, nel suo ruolo di specifica barriera agli antigeni all'interno del lume.

Una valutazione di queste caratteristiche fornisce la chiave, per comprendere come un sistema immunitario secretorio stimolato protegga l'ospite contro gli effetti nocivi di *E. coli* enteropatogeni. Il tipo di azione più evidente è quello della neutralizzazione della tossina da parte di anticorpi IgAS, legati alla mucina apicale (Linggood e Ingram, 1978). Se una qualsiasi tossina dovesse riuscire ad attraversare la barriera mucosale, è verosimile che gli anticorpi IgA nella Lamina Propria la neutralizzino e ne provochino l'eliminazione, senza l'insorgenza di effetti tossici o di una infiammazione dannosa (Peppard e coll., 1981). I corpi batterici interi possono essere agglutinati da altri anticorpi IgAS nel lume e gli aggregati di batteri così formati sono rimossi ed eliminati dalla peristalsi (Porter, Parry e Allen, 1977). Un fattore importante nella virulenza batterica, di cui il famoso antigene K88 fornisce un esempio eccellente, è la capacità del microrganismo di aderire agli enterociti della mucosa (Smith e Linggood, 1971; Evans e coll., 1975). Sebbene una misura sostanziale di protezione può essere ottenuta somministrando colostro o latte ricchi di anticorpi per l'antigene K88, risulta che tali anticorpi non sono facilmente generabili per via mucosale, tramite vaccini sicuramente inattivati. In questo caso tuttavia, le capacità del sistema immunitario secretorio hanno oltrepassato le nostre aspettative, con la produzione di anticorpi che attaccano proprio il cuore del complesso K88 (Linggood e Porter, 1980). Essi non colpiscono l'antigene adesivo di per sé, ma eliminano il gene responsabile della sua espressione. In questo modo suini immunizzati, infettati con *E. coli* enteropatogeni recanti l'antigene K88, eliminano quantità via via crescenti di E. coli K88$^-$ per altro identici, fino a uno stato in cui gli *E. coli* eliminati nelle feci sono tutti privi dell'antigene K88.

Naturalmente, il suinetto neonato viene gettato in un ambiente

molto ostile, di solito pesantemente contaminato da patogeni diffusi dalla madre, ma senza una propria protezione immunitaria significativa. Il suo sistema immunitario secretorio non ha avuto tempo di organizzarsi e di solito impiega circa 4-5 settimane per farlo. In questa situazione, l'intestino del neonato dipende interamente dal colostro e dal latte della madre per la protezione anticorpale. È per questa ragione che i secreti mammari sono così ricchi in anticorpi; così, se l'immunologo deve intervenire fornendo una più efficace protezione anticorpale, è il sistema immunitario della scrofa che deve essere stimolato. Ciò può apportare benefici in due modi. Il primo consiste nella riduzione del numero dei microrganismi patogeni eliminati dalla scrofa, usando efficacemente le sue immunoglobuline mucosali intestinali, e il secondo nella stimolazione di una più efficace risposta anticorpale colostrale, come descritto nella sezione seguente.

Lo scopo principale della vaccinazione per via orale è di «inserire» efficacemente questi e tutti gli altri meccanismi benefici, prima che l'animale sia esposto a qualsiasi grave insulto infettivo. Non c'è dubbio che un sistema immunitario secretorio opportunamente stimolato è una risorsa estremamente potente per un animale minacciato da patogeni ambientali; la sfida tecnologica deriva dal requisito di ottenere un'adeguata stimolazione a tempo debito.

La vaccinazione per via orale. Un approccio pratico alla stimolazione del sistema immunoglobulinico mucosale

Il semplice possesso di un sistema immunoglobulinico mucosale operativo non è sufficiente di per sé a fornire protezione contro la infezione da *E. coli*; il sistema deve essere messo in allarme e attivato in forma specifica. In sostanza ciò significa che l'apparato immunopoietico deve essere «istruito» a sintetizzare anticorpi secretori che riconoscano gli *E. coli* dei sierotipi adeguati, assieme ai loro prodotti tossici. Le «istruzioni» devono contenere dettagliate informazioni a livello molecolare per il tessuto linfoide dell'intestino (informazioni sulle strutture chimiche del rivestimento batterico e le varie tossine associate ecc.). Queste informazioni, che costituiscono le componenti essenziali del vaccino, sono incorporate o nei microrganismi stessi, o in

frammenti batterici riconoscibili immunologicamente, o in estratti dei microrganismi.

L'interazione del sistema immunitario mucosale esterno con quello sistemico interno è molto complessa e fino ad ora solo in parte compresa. La sua complessità è sottolineata dal fatto che, in certe circostanze, la somministrazione di un antigene per via orale provoca uno stato di non-reattività sistemica (Chase, 1946; Asherson e coll., 1977). Inoltre, in certe circostanze, la somministrazione per via orale combinata con quella parenterale può sfociare nella soppressione delle risposte mucosali (Pierce e Korter, 1980). Nei mammiferi esistono chiaramente numerose e complesse reti di regolazione (Strober e coll., 1981) e bisogna avere grande cura nella produzione dei vaccini di uso orale e negli schemi di impiego, per garantire che si instaurino piuttosto che si aboliscano le risposte desiderate.

Il repertorio e la quantità degli anticorpi prodotti saranno naturalmente determinati dalla natura degli antigeni con cui il sistema è posto a confronto e, in questi termini, un vaccino di uso orale inadeguato sarebbe quello in cui i costituenti batterici essenziali siano incompletamente rappresentati. Al contrario, un buon vaccino sarebbe quello che contiene quote adeguate di tutti i costituenti batterici, contro cui sono necessari anticorpi. Diventa adesso immediatamente evidente che il repertorio più completo di anticorpi sarebbe generato dai microrganismi viventi stessi (Stokes e coll., 1979), poiché questi incorporano tutte le specificità antigeniche. Non è una sorpresa che taluni specialisti raccomandino effettivamente l'uso di microrganismi viventi, come migliore strumento pratico di produzione di immunità protettiva (Kohler e coll., 1975); i rischi sono però elevati ad un livello inaccettabile, particolarmente nei moderni sistemi di conduzione intensiva. L'introduzione di un'infezione intestinale con batteri patogeni può sfociare alla fine in una risposta immunitaria completa ma, prima che si realizzi una protezione significativa, la proliferazione dei batteri può farsi esuberante, provocando gravi danni a quello stesso intestino che da questi doveva essere protetto. Allo stesso tempo i batteri patogeni eliminati con le feci continuano a contaminare l'ambiente, accumulando una triste eredità di infettività ambientale.

Alcuni degli effetti dannosi dei vaccini a base di *E. coli* enteropatogeni viventi sono illustrati nella tabella 1, che riassume i risultati

di un piccolo studio comparativo, su suinetti nati da scrofe immunizzate con vaccini vivi e da scrofe normali. Il danno provocato dai batteri albergati e diffusi dalle scrofe fu tale, che i suinetti risultarono di scarso peso alla nascita, con un alto tasso di mortalità ed incrementi ponderali disastrosamente bassi fino ai 14 giorni d'età, nonostante buoni livelli di anticorpi nel colostro.

TAB. 1 - EFFETTO DI E. COLI ENTEROPATOGENI VIVENTI SULLE PRESTAZIONI DI SUINETTI NATI DA SCROFETTE IMMUNIZZATE CON VACCINO VIVO

Trattamento	Numero di scrofette	Pesi medi alla nascita	Sopravvivenza a 14 giorni %	Peso medio a 14 giorni Kg
E. coli (O149) vivo, per via orale, a 90-95 giorni di gravidanza	4	0,97	81,48	2,69
Controlli non infettati	4	1,31	96,70	4,50

L'effetto di tali infezioni sull'intestino del suinetto è vividamente dimostrato dai risultati di misurazioni degli intestini infetti, per mezzo dell'analizzatore ad immagine Quantimet M20B (Allen, 1980). Misurazioni del perimetro di sezioni trasversali dell'intestino rivelarono che l'infezione con *E. coli* enteropatogeni causava una riduzione fino all'80% della superficie esposta al lume. Dopo i processi di riparazione con la guarigione dall'infezione, questa superficie non è adeguatamente rimpiazzata, con esito di impedimento persistente piuttosto che temporaneo alla nutrizione.

Problemi pratici quindi precludono l'impiego di vaccini di uso orale, basati su batteri viventi sia per le scrofe che per i suinetti, poiché le perdite nelle prestazioni degli animali e i rischi per l'ambiente dell'azienda sono inaccettabili nei moderni sistemi agricoli. Per trovare un'efficace alternativa, l'immunologo deve imparare dalla risposta alle infezioni naturali e cercare di ricrearne gli aspetti essenziali, per mezzo di vaccini attentamente ideati e di schemi d'impiego, senza interferire con le produzioni animali.

I due estremi dello spettro di risposte immunitarie dell'intestino sono rappresentati dai suini «germ free» da un lato e dai suini infetti dall'altro. I suinetti provenienti da e matenuti in uno stato «germ free» non producono praticamente anticorpi nei fluidi e nei tessuti corporei. L'attività della cellula linfoide del tessuto intestinale è trascurabile e resta molto bassa negli animali allevati in un ambiente «germ free», anche fino a 7 settimane d'età (Porter e coll., 1974). Al contrario, la Lamina Propria dell'intestino, negli animali con una normale flora batterica intestinale, è estesamente infiltrata da linfociti e plasmacellule entro le 3 settimane di vita. La flora enterica costituisce un notevole stimolo antigenico e, tanto più grande è lo stimolo antigenico, tanto maggiore è il livello di attività cellulare che vi si contrappone, con il risultato di elevati livelli di immunoglobuline secretorie (Heremans, 1974).

Allorché animali mantenuti in condizioni «germ free» sono infettati con una coltura pura di un singolo sierotipo di *E. coli*, vi è una decisa risposta linfocitaria intestinale, con la produzione di specifici anticorpi secretori. Nello sviluppo di efficaci vaccini di uso orale, ebbe la massima importanza la logica scoperta, che la somministrazione ripetuta per via orale dello stesso ceppo di *E. coli* inattivato al calore portava ad una analoga risposta linfocitaria. Tali preparazioni antigeniche stimolano anche le risposte del sistema immunoglobulinico mucosale di animali normali, come dimostrato da studi su suini con tragitto fistoloso, in cui l'applicazione locale dell'antigene produceva risposte anticorpali locali, dominate da IgA (Porter e coll., 1974). Come sarà discusso nella sezione successiva, il repertorio di anticorpi così prodotto dovrebbe essere sostanzialmente completo, poiché tutti i meccanismi effettoriali essenziali sembrano essere disponibili, anche se i microrganismi viventi stimolano una risposta quantitativamente superiore.

Così, gli antigeni batterici estratti forniscono il mezzo per generare risposte anticorpali efficaci, senza i pericoli di infezioni da germi viventi. Per utilizzare questi meccanismi in azienda, è essenziale sapere quando il sistema immunitario del suinetto può rispondere e perciò quando si dovrebbe introdurre l'antigene.

Studi sull'ontogenesi del sistema immunitario secretorio nei suinetti hanno rivelato che risposte utili possono essere ottenute fin dalla prima settimana di vita (Allen e Porter, 1977; Baljer, 1980; Chap-

man e coll., 1974). Prima che il sistema maturi pienamente, gli anticorpi IgM sono immessi in servizio come immunoglobuline secretorie e costituiscono la classe immunoglobulinica dominante prodotta dagli immunociti intestinali, sia del gnotobiotico che del neonato; gli anticorpi IgA assumono il loro ruolo dominante solo dopo 4 settimane circa. La regolare somministrazione per via orale di adatti antigeni di *E. coli* si è dimostrata efficace nel conferire protezione a giovani suini in numerose esperienze nell'arco di molti anni (ad es. Porter e coll., 1973; Baljer, 1980; Dziaba e coll., 1980). Questa somministrazione precoce «arma» il suinetto in preparazione allo svezzamento e accelera in generale il ritmo con cui il sistema si organizza per respingere l'assalto dei patogeni batterici.

La vulnerabilità del neonato è stata sottolineata nella prima sezione ed è ora molto chiara la pressante necessità di protezione passiva derivante dalla scrofa nelle prime due settimane. Nella specie suina non c'è alcun trasferimento di immunoglobuline tra i tessuti materni e quelli fetali nel periodo antecedente al parto. Al contrario, il colostro è fornito di una ricca quota di anticorpi per la protezione passiva della progenie. Questi sono assorbiti attraverso l'epitelio intestinale del neonato, principalmente nel primo giorno di vita o pressapoco. Così il naturale ritardo nello sviluppo dell'immunità attiva nel suinetto dovrebbe essere considerato non tanto come una sciagurata carenza, ma piuttosto come un aggiustamento di solito adeguato, che ha portato ad operare sotto un ombrello di completa protezione iniziale fornita dalla scrofa. Il problema per l'allevatore sorge dal fatto che i moderni sistemi intensivi esercitano una tensione insostenibile su questo processo naturale di sviluppo, cosicché il sistema in delicato equilibrio si rompe, sia per l'eccessiva carica batterica assorbita molto precocemente, che per la quota insufficiente di anticorpi materni. La soluzione consiste nell'imbrigliare il sistema immunitario delle scrofe, istruendolo a produrre quote sufficienti degli anticorpi adatti a tempo debito.

In questa situazione vi sono due obiettivi principali: ridurre la carica di batteri patogeni eliminati nell'ambiente (rafforzando il sistema immunitario secretorio della scrofa) e ottimizzare l'immunità passiva fornita dal colostro. In condizioni naturali, questi obiettivi potrebbero essere visti come mutualmente esclusivi, poiché la colonizzazione intestinale è lo stimolo naturale che influenza il livello di

secrezione anticorpale nel colostro della scrofa (Saif e coll., 1972) ma, ironicamente, è anche la fonte principale di infezione del neonato. Partendo da questo punto di vista accettato, fu condotta un'indagine sistematica sulla distribuzione degli anticorpi per classi (Porter, Linggood e Childlow, 1978). Ciò fu una tappa essenziale nella definizione delle caratteristiche della risposta materna che potesse fornire la migliore protezione al neonato. Ciò avrebbe consentito in seguito la produzione di idonei vaccini e di schemi di impiego per produrre lo stesso effetto, ma senza necessariamente contaminare l'ambiente.

A quattro scrofe furono somministrati *E. coli* viventi O149, K91, K88 ac alla dose di 5 X 10^{10} microrganismi al giorno per 3 giorni, per via orale. Due scrofe furono trattate all'88°, 89° e 90° giorno di gravidanza e le altre due al 100°, 101° e 102° giorno di gravidanza; procedure simili a quelle sostenute da Kohler (1975) nella vaccinazione autogena contro la colibacillosi neonatale.

Il test cruciale da mettere a punto in questi dati è l'efficacia degli anticorpi materni nel fornire un solido stato d'immunità passiva contro le infezioni neonatali. La colibacillosi enterica neonatale può essere uniformemente riprodotta in infezioni sperimentali, con un alto tasso di mortalità. In questi studi il livello di mortalità nel gruppo di animali di controllo fu del 76% (Chidlow e Porter, 1979). La progenie delle scrofe, che ricevevano i due tipi di somministrazione orale di *E.* coli viventi, dimostrò una spiccata protezione passiva, con mortalità ridotta al 7% e al 25% rispettivamente; ci fu però una marcata modificazione nel profilo immunoglobulinico della funzione anticorpale, correlata con la differente sequenza temporale degli schemi di infezione (Tabella 2). Ciò è forse correlato con lo stato ormonale degli animali in via di modificazione in questo stadio critico della gravidanza (che si avvicina al momento della formazione del colostro); qualunque sia la spiegazione, ciò è però del tutto coerente con l'opinione, che gli anticorpi IgM sono gli agenti ideali di protezione passiva della progenie da parte della scrofa (Chidlow e Porter, 1978).

Lo stesso tipo di profilo anticorpale colostrale è stato ottenuto in studi sull'immunizzazione della scrofa per via orale tramite prodotti antigenici di *E. coli*, anche se i livelli globali di attività anticorpale tendevano ad essere insufficienti per far fronte con affidabilità a gravi infezioni. Fortunatamente, si scoprì anche che ciò poteva essere evocato da un'iniezione intramuscolare degli stessi antigeni eseguita a

tempo debito, senza perdere la necessaria distribuzione degli anticorpi. Anche questo è illustrato nella Tabella 2, che riassume i dati ottenuti nell'esperimento seguente.

Gli antigeni di *E. coli* furono incorporati nella dieta tramite una matrice di trasporto e somministrati con un dosaggio giornaliero di antigene libero derivante da circa 2 X 10^9 corpi batterici di *E. coli*, dal 50° giorno di gravidanza fino al parto. Ricerche precedenti in animali con tragitto fistoloso avevano stabilito che ciò era circa 40 volte in eccesso, rispetto alla minima dose giornaliera richiesta per stimolare la secrezione anticorpale intestinale. Ciò venne calcolato per fornire lo stimolo antigenico primario ottimale, così da promuovere la produzione di anticorpi IgM umorali, in seguito ad una singola somministrazione di antigene per via parenterale. Il picco della risposta anticorpale delle scrofe prima del parto fu regolato in modo che coincidesse con la formazione del colostro e che elevati livelli di anticorpi IgM fossero disponibili con il colostro per la protezione dei neonati. Con il predominio di IgM nella distribuzione degli anticorpi (Tavola 2), questa risposta era paragonabile all'assetto ideale nei processi naturali, indicato dal migliore fra gli schemi di colonizzazione intestinale.

Vi sono così ampi riscontri per dimostrare che il sistema immunoglobulinico mucosale può essere efficacemente istruito per mezzo di adatti antigeni batterici inattivati. Le risposte possono essere «inserite» in tempo per fornire una valida protezione, nel periodo in cui i suinetti sarebbero altrimenti nella loro condizione più vulnerabile. I suinetti possono essere protetti prima dello svezzamento, stimolando il sistema immunitario della scrofa con uno schema di somministrazione per via orale per 60 giorni di antigeni di *E. coli*, insieme ad una singola iniezione intramuscolare 21 giorni prima del parto. La protezione allo svezzamento può essere ottenuta somministrando lo stesso antigene ai suinetti in età precoce nella massa dell'alimento, inducendo così risposte immunitarie mucosali di tipo IgM e IgA.

Meccanismi effettoriali immunobiologici derivanti dalla vaccinazione per via orale con antigeni di E. coli

L'intestino di un animale normale contiene una ricca e variegata

popolazione di batteri, dove gli *E. coli* non patogeni costituiscono una componente estremamente importante della flora intestinale degli animali sani. Quando prevalgono ceppi enteropatogeni, vengono prodotte grosse quantità di enterotossine, che agiscono localmente sulle cellule dell'epitelio intestinale, distruggendo il normale equilibrio di liquidi ed elettroliti e dando origine alla «diarrea da *E. coli*». Il trattamento degli animali colpiti con farmaci, che eliminano la maggior parte della flora intestinale, produrrà uno «spazio vuoto» innaturale, che sarà prontamente colonizzato dai primi microrganismi resistenti al farmaco disponibili. Il grande vantaggio dei meccanismi immunitari è che sono specifici e possono essere stimolati per agire su batteri potenzialmente dannosi, o sui loro prodotti tossici, senza distruggere l'equilibrio dei batteri naturali non patogeni presenti.

Il meccanismo di controllo degli anticorpi sulla componente patogena della flora intestinale non è stata ancora del tutto chiarita. McClelland e coll. (1972) dimostrarono che gli anticorpi IgA nelle secrezioni gastro-intestinali agglutinavano un'ampia serie di microrganismi enterici e postularono che gli agglutinati, anche in assenza di lisozima e complemento, possono ridurre la capacità di un microrganismo di colonizzare l'intestino, aumentando la sua eliminazione da parte della peristalsi intestinale. Gli anticorpi IgA secretori, in presenza di complemento e lisozima, lisano gli *E. coli* (Adinolfi e *coll.*, 1966; Hill e Porter, 1974). Vi sono adeguati livelli di lisozima nelle secrezioni intestinali per effettuare la batteriolisi, ma non c'è alcun riscontro di una sequenza funzionale del complemento, cosicché la batteriostasi sembra essere il meccanismo antibatterico più probabile, attribuibile agli anticorpi IgA nel lume intestinale. L'attività di protezione antibatterica in vitro delle secrezioni intestinali ricavate da suini fistolizzati, 10 giorni dopo l'immunizzazione locale delle anse intestinali con *E. coli* inattivato al calore, fu dimostrata da Porter e coll. (1974a); il riscaldamento delle secrezioni a 56°C non eliminava l'attività batteriostatica (Tabella 3). L'attività antibatterica fu anche dimostrata in vivo, in seguito all'immunizzazione per via orale della progenie di 42 scrofe con O149 inattivato al calore; in questo esperimento ci fu una riduzione significativa nel numero di *E. coli* emolitici (ceppi O149 e O139) nelle feci degli animali trattati con l'antigene (Porter e coll., 1974b).

Oltre al suo effetto antibatterico, l'immunizzazione per via orale dei suini con *E. coli* inattivati al calore può portare a una diminuita sensibilità dell'intestino del suino alle enterotossine di *E. coli* (Linggood e Ingram, 1978). In esperimenti condotti al Royal Veterinary College, fu osservato che dopo la somministrazione a suini di una razione supplementata con un vaccino prodotto nel nostro laboratorio con *E. coli* inattivati, essi divennero «insensibili» alle enterotossine di *E. coli*, come dimostrato da prove su segmenti intestinali legati, trattati con preparazioni abatteriche della forma termo-labile (LT) o termo-stabile (ST) della enterotossina. Le secrezioni intestinali dei suini alimentati con la razione contenente l'antigene, (ma non quelle dei fratelli tenuti senza il vaccino), neutralizzavano passivamente le preparazioni di tossina LT nell'intestino legato di coniglio.

Per poter evitare l'effetto di «risciacquo» della peristalsi intestinale, molti ceppi enteropatogeni di *E. coli* producono adesine, che gli consentono il legame con specifici recettori sulle cellule della mucosa intestinale. Finora sono state identificate 5 differenti adesine nei ceppi patogeni per il suino (K88ab, K88ac, K88ad, K99 e 987P). L'adesione del fattore K88 di *E. coli* agli enterociti dei suinetti può essere bloccata da antisieri specifici in vitro (Parry e Porter, 1978; Evans e coll., 1980) e la vaccinazione di una scrofa con una preparazione purificata di K88 può conferire l'immunità passiva alla progenie verso un ceppo patogeno $K88^+$ (Rutter e Jones, 1973). Tuttavia, gli anticorpi anti-K88 non sono essenziali per la protezione dei suinetti dagli enteropatogeni $K88^+$ (Porter e coll., 1978). Si scoprì che l'immunizzazione delle scrofe con antigeni di *E. coli* inattivati al calore, con combinazione della via orale con quella parenterale, conferiva buona protezione alla progenie, anche se i livelli degli anticorpi anti-K88 nei campioni di colostro erano comparabilmente bassi.

Differenti schemi di immunizzazione producevano livelli più elevati di anticorpi anti-K88, ma il livello di protezione nei neonati di queste scrofe era inferiore (Tavola 2). Il vaccino usato conteneva l'antigene K88, ma chiaramente non stimolava una risposta anticorpale superiore quand'era somministrato per via orale.

Tuttavia, recenti osservazioni hanno indicato che gli anticorpi nelle secrezioni di animali immunizzati per via orale possono impedire l'adesione mediata dal K88 con un altro meccanismo, dando cioè origine alla perdita del plasmide del K88 nei ceppi enteropatogeni. L'a-

desione mediata dal K88 e la capacità dei sierotipi K88$^+$ di colonizzare e proliferare nella porzione superiore dell'intestino degli animali infetti dipende dalla presenza del plasmide K88; la perdita di questo plasmide è stata osservata sia nei suini svezzati, trattati con il vaccino inattivato citato in precedenza, che nelle madri, durante la sperimentazione dello schema di vaccinazione abbinata orale/parenterale Linggood e Porter, 1980). In condizioni normali di conduzione aziendale la scrofa è probabilmente la principale riserva di infezione per la sua progenie. Perciò, per riprodurre un'infezione naturale, le scrofe furono infettate con *E. coli* O149: K91, K88ac appena prima del parto, per far sì che esse eliminassero i patogeni nell'ambiente dei loro suinetti appena nati (Linggood e Porter, 1980). Tuttavia, con il passaggio lungo l'intestino della scrofa immunizzata, il patogeno cominciava a perdere il plasmide del K88 e, in un esperimento, l'O149 eliminato dalla scrofa poco dopo il parto era al 70% K88$^-$. La mescolanza di ceppi K88$^+$ e K88$^-$ veniva trasmessa ai suinetti, che ricevevano gli anticorpi «eliminanti il plasmide» nel colostro e nel latte; il processo di esclusione del K88 continuò egualmente e la proporzione della variante K88$^-$ nelle feci dei suinetti aumentò col tempo, fino a formare praticamente il 100% della popolazione di O149. Quando i suinetti di controllo, che succhiavano da una scrofa non immune, furono infettati con la coltura mista di K88$^+$ e K88$^-$, eliminati dalla scrofa immune, la variante K88$^+$ formò ben presto il 100% degli O149 eliminati e metà dei suinetti non protetti morirono nelle prime 48 ore, dimostrando così la necessità fondamentale della continua presenza di anticorpi nel colostro e nel latte.

Vi erano perciò 2 fasi in questo fenomeno di esclusione, di cui quella iniziale avveniva nella scrofa e quella successiva, consistente nel mantenimento di una pressione selettiva a favore della variante non adesiva K88$^-$, nei suinetti che ricevevano il latte immune. Questa attività di esclusione del K88 può essere dimostrata in esperimenti di coltura in vitro con latti immuni ed antisieri; si dimostrò che era dovuta all'azione selettiva degli anticorpi sulla forma K88$^+$ dei ceppi di *E. coli* che consentiva ai derivati K88$^-$ di crescere estesamente e di predominare nella coltura (Linggood e Porter, 1978, 1980). Il cambiamento nei batteri era stabile e non c'era alcuna inversione del fenotipo da K88$^-$ a K88$^+$; si era avuta cioè la perdita del plasmide del K88 e non la soppressione temporanea del suo effetto. L'attività di

esclusione dei sieri immuni non era specifica per il sierotipo e il plasmide del K88 poteva essere eliminato da un'ampia serie di sierogruppi O con l'impiego dei sieri immuni (Linggood, Ellis e Porter, 1979).

Gli effetti benefici dell'immunizzazione per via orale degli animali possono essere perciò suddivisi in 2 categorie:

1) l'effetto a breve termine sull'animale ospite; vi sarà protezione immediata dai patogeni, dovuta agli anticorpi antibatterici ed antitossici;

2) l'effetto ambientale a lungo termine. Si abbassa il numero totale degli *E. coli* enteropatogeni eliminati dagli animali immunizzati. Inoltre, per l'eliminazione del plasmide mediata dagli anticorpi, la virulenza dei ceppi può essere ridotta. Ciò condurrà a una riduzione della carica infettante batterica, costituita dagli *E. coli* enteropatogeni nell'ambiente dell'azienda.

Benefici globali forniti da un'efficace immunità mucosale nelle condizioni di campo

Qualsiasi sistema di vaccinazione per via orale deve essere provato non solo per il tipo, la quantità e la localizzazione degli anticorpi prodotti (cioè per le caratteristiche immunologiche), ma anche per la sua efficacia di campo. Così, un'adeguata valutazione deve essere in termini di parametri produttivi (quali il tasso di crescita, gli indici di conversione alimentare, l'uniformità delle dimensioni, il tasso di sfruttamento, ecc.), come pure dei soliti parametri clinici (ad es. Porter e coll., 1973). I due approcci alla vaccinazione per via orale dei suini (l'uno basato sulla protezione passiva dei suinetti neonati tramite la scrofa, l'altro sull'immunizzazione attiva dei suinetti appena svezzati) sono stati sperimentati in questo periodo con numerose prove in molti Paesi. Cosa ancora più significativa è che sono stati sottoposti alla prova forse più severa: quella della valutazione commerciale da parte degli allevatori, che cercano miglioramenti tangibili nella resa economica delle loro aziende. Uno schema di vaccinazione della scrofa, derivante dalle considerazioni esposte nelle sezioni 2 e 3, fu valutato in una prova con un totale di 1.500 figliate, in 9 aziende con

problemi di diarrea da *E. coli*. Alle scrofe furono somministrati antigeni di *E. coli* nella razione, da 8 settimane dopo la monta fino al parto, oltre a una singola iniezione intramuscolare degli stessi antigeni eseguita tra 18 e 25 giorni prima della data presunta del parto. La Tavola 4 mostra i benefici forniti da questo trattamento in termini di mortalità neonatale percentuale, di necessità di terapia antibiotica e di numero di svezzati per figliata. In queste condizioni, l'efficace immunità mucosale (attiva nella scrofa, passiva nei suinetti) riduceva la mortalità neonatale di circa il 50%, producendo 1,02 suini svezzati in più in una figliata media; il che aveva richiesto il 52% in meno di terapia medica.

In uno studio su scala molto più ridotta che paragonava vaccini vivi e inattivati, Barfod (1980) riscontrò che una procedura di vaccinazione con il vaccino inattivato prodotto nel nostro laboratorio produceva lo stesso livello di protezione dell'infezione naturale, ma senza l'eliminazione di patogeni pericolosi nelle feci delle scrofe.

Il valore di simili vaccini di uso orale inclusi nella massa dell'alimento fu esaminato in una prova su 10 aziende con problemi di diarrea post-svezzamento. Lo svezzamento fu eseguito a 28 giorni di età e la vaccinazione per via orale (a mezzo di antigeni di *E. coli* aggiunti nella massa dell'alimento) fu cominciata a 14 giorni d'età. I pesi dei suinetti che ricevevano il vaccino furono paragonati con quelli di controlli non vaccinati a 14 giorni, di nuovo al momento dello svezzamento e quindi a 56 giorni, un mese dopo lo svezzamento. I risultati, esposti nella Tabella 5, indicano che la vaccinazione per via orale dei suinetti con antigeni di *E. coli* inattivati può fornire notevoli benefici di crescita, in presenza di una carica infettante ambientale potenzialmente dannosa. La misurazione dell'incremento ponderale (il parametro produttivo più facilmente quantificabile e più rilevante) consente una valutazione realistica del beneficio totale per l'allevamento e include gli aspetti sub-clinici che non possono essere altrimenti stimati.

Questi benefici non dovrebbero essere considerati naturalmente una promozione della crescita, bensì, principalmente, un'attenuazione nell'arresto della crescita dopo lo svezzamento. Questo effetto è di solito più pronunciato durante le prime settimane dopo lo svezzamento, quando l'arresto della crescita dovuto all'infezione da *E. coli* è di solito più grave. Per beneficiare normalmente delle sostanze nutritive di-

sponibili, l'integrità strutturale e funzionale della mucosa intestinale deve essere mantenuta anche di fronte a una minaccia costante di infezione; è un compito per il quale è adatto un sistema immunoglobulinico mucosale stimolato.

Miglioramenti negli incrementi ponderali furono riferiti da Dziaba e coll. (1980), in una sperimentazione in cui suinetti vennero immunizzati per via orale con dosi giornaliere di antigeni di *E. coli*, inattivati al calore. In questo studio, il vaccino di uso orale non fu introdotto finché gli animali non furono svezzati ed i risultati furono complicati dalla presenza concomitante di altre infezioni quali broncopolmonite, enterite necrotica superficiale ed enterovirosi. Anche in queste condizioni, i dati indicarono chiaramente un vantaggio ponderale, che era dovuto probabilmente all'immunità mucosale.

I vantaggi ponderali non sono naturalmente i soli criteri di giudizio per un efficace vaccino di uso orale. Baljer e coll. (1976) eseguirono delle prove di campo con un vaccino, costituito da *E. coli* inattivati al calore, somministrato in dosi giornaliere per i primi 10 giorni di vita, e riscontrò che i suinetti erano ben protetti dalla diarrea colibacillare, durante le prime critiche fasi della vita. In studi ulteriori (Baljer, 1980) furono confermati la specificità ed il precoce sviluppo della protezione. I suinetti vennero vaccinati solo al primo e al secondo giorno di vita ed infettati quindi a distanza di 4 ore soltanto dalla seconda dose. Il 70% del gruppo di controllo non immunizzato contrasse una diarrea acquosa, contro il 15% soltanto del gruppo immunizzato. Inoltre, per mezzo del test dell'ansa legata, si dimostrò che gli intestini degli animali immunizzati erano capaci di resistere ad una carica infettante 10 volte maggiore, rispetto a quelli del gruppo di controllo non immunizzato. Infine, il numero dei batteri, che restavano sulla o nella mucosa degli animali immunizzati (4 ore dopo l'infezione), ammontava a meno dell'1% di quello riscontrato negli animali immunizzati con un sierotipo differente di *E. coli*.

Evidentemente, la protezione consentita dalla vaccinazione per via orale con antigeni di *E. coli* può essere apprezzata soltanto in presenza di una carica infettante ambientale potenzialmente dannosa. In una prova di campo, condotta in un'azienda con una storia di problemi post-svezzamento da *E. coli* (Barfod, 1980), non si riscontrò alcuna differenza significativa nell'incidenza di diarrea e di mortalità tra il gruppo vaccinato per via orale e quello di controllo. Tuttavia, al mo-

mento della sperimentazione, la carica infettante batterica era evidentemente piuttosto bassa, dato che la diarrea e la mortalità in entrambi i gruppi erano scese a livelli molto bassi dopo lo svezzamento.

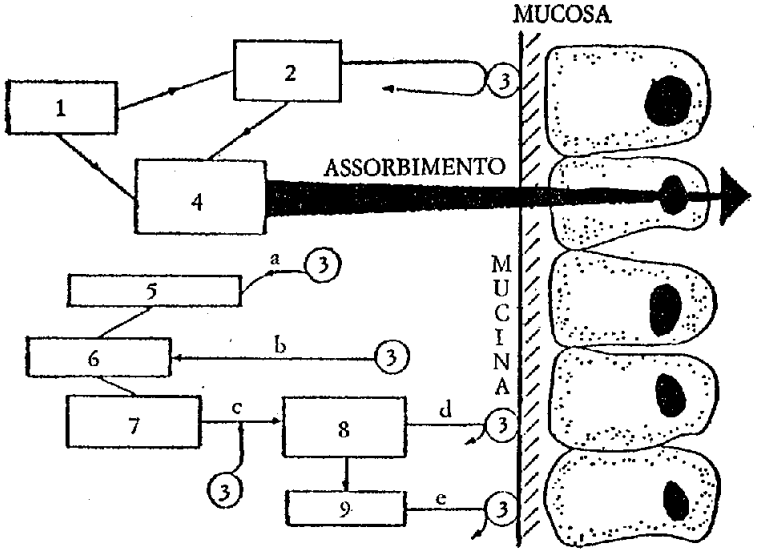
La larga esperienza in un gran numero di aziende con il vaccino di uso orale, da *E. coli* inattivati, prodotto nel nostro laboratorio, concorda interamente con i riscontri degli studi di laboratorio e delle prove su scala più ridotta. Inoltre, sono stati riferiti vari altri vantaggi che erano a prima vista piuttosto sorprendenti; essi vengono ora esaminati con maggiore dettaglio. Il quadro che sta emergendo è di una modificazione stabile delle relazioni ospite-patogeno a favore dell'ospite, creata dall'impiego continuato dei vaccini anti *E. coli* di uso orale. Ciò influenza la salute in generale e le prestazioni, riducendo l'incidenza di mastiti, metriti e diarree e migliorando i pesi alla nascita, la dimensione, l'uniformità come pure la crescita delle figliate.

I vari vantaggi di ordine profilattico, descritti in questa sezione, sono stati ottenuti con l'adozione di procedimenti di controllo mediati da anticorpi, del tutto naturali. I miglioramenti in prestazioni, nutrizione e salute derivano dal rafforzamento di una normale funzione intestinale, che controlla l'equilibrio nelle relazioni ospite-patogeno. Gli *E. coli* sono agenti opportunisti nell'ambiente dell'azienda ed il buon andamento dello svezzamento dipende dalla competenza immunitaria dell'ospite. Nei moderni sistemi agricoli, le spinte per gli aumenti produttivi (che portano ad es. ad aumentato sfruttamento ed intensificato adattamento degli animali) hanno contribuito a spostare l'equilibrio molto a favore del patogeno.

Gli *E. coli* patogeni sono raramente invasivi nel suino, operando interamente alla superficie dell'intestino, dove provocano i loro effetti dannosi per mezzo di metaboliti tossici. La contromisura logica e naturale è il rafforzamento dell'immunità di superficie nell'ospite recettivo, utilizzando meccanismi perfettamente adatti a tale compito.

In conclusione, sebbene vi sia ancora molto da imparare sui fattori che agiscono sull'equilibrio ospite-patogeno e sul loro impatto sulla salute e le prestazioni, l'esperienza fin qui ottenuta fornisce fondamenta feconde ed incoraggianti, su cui costruire a beneficio dell'agricoltura.

FIG. 1 - FUNZIONI DIFENSIVE DEL SISTEMA IMMUNOGLOBULINICO SECRETORIO



1 = Dieta

2 = Antigeni intatti

3 = Anticorpi secretori (AbS)

4 = Sostanze nutritive digerite

5 = Non patogeni

6 = Batteri

7 = Patogeni

8 = Più patogeni

9 = Tossine

a = Proliferazione mantenuta

b = Scambio del plasmide bloccato

c = Proliferazione inibita

d = Adesione inibita

e = Escluse e neutralizzate

TAB. 2 - PROTEZIONE NEONATALE DOPO VACCINAZIONE DELLA SCROFA PER VIA ORALE E PARENTERALE

Via di immunizzazione della scrofa	Figliate	N° di suinetti	Titolo medio anti K88	Titolo medio anti «O»	Distribuzione degli Ab anti «O»	Mortalità nella prova d'infezione
Controlli	4	46	2	64	Non misurabile	76%
(1) 88-90 gg. Vaccino vivo per via orale	2	14	1.024	2.048	IgM 79% IgA 16% IgG 5%	7%
(2) 100-102 gg.	2	12	128	4.096	IgA 46% IgM 35% IgG 19%	25%
Stimolazione per via orale; richiamo i.m.	4	42	16	8.192	IgM 89% IgA 6% IgG 5%	2%
Doppia iniezione	2	23	1.024	2.048	IgG 86% IgM 9% IgA 5%	36%

TAB. 3 - ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DELLE SECREZIONI INTESTINALI DOPO IMMUNIZZAZIONE LOCALE

	N° medio di unità formanti colonia dopo incubazione per:		
	0 ore	3 ore	5 ore
E. coli O149			
+ Sol. Fis.	$9,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^7$	$> 10^9$
E. coli O149			
+ secrezione	$4,0 \times 10^4$*	$3,0 \times 10^6$	$> 10^9$
intestinale	$3,0 \times 10^4$**	$1,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
E. coli O149			
+ secrezione			
intestinale	$5,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^6$	10^9
riscaldata a 56°C	$8,0 \times 10^4$**	$2,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
E. coli O149			
+ secrezione			
intestinale	$6,0 \times 10^4$*	$2,6 \times 10^6$	$> 10^9$
+ complemento	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^3$

* Secrezioni intestinali di ansa con fistola Thiry-Vella prima dell'immunizzazione locale con *E. coli* O149 inattivati al calore.

** Secrezioni intestinali prelevate 10 giorni dopo immunizzazione locale con *E. coli* O149 inattivati al calore.

TAB. 4 - RIDUZIONE DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA, DELLA MORTALITÀ NEONATALE E AUMENTO DELLE MEDIE DI SVEZZAMENTO, ASSOCIATI ALLA VACCINAZIONE ORALE/PARENTERALE DELLE SCROFE CON ANTIGENI DI E. COLI

Azienda	Figliate		Riduzione della terapia antibiotica (%)	Diminuzione della mortalità neonatale (%)			Suini svezzati in più per figliata media
	Vaccinate	Controlli		da	a	differenza	
1	127	98	38	15,1	7,8	7,3	0,39
2	34	28	94	19,4	6,8	12,6	1,48
3	104	126	24	17,1	8,7	8,4	1,20
4	35	25	2	18,5	11,2	7,3	1,16
5	42	72	11	15,4	8,0	7,4	1,64
6	30	27	8	12,9	7,0	5,9	0,60
7	17	16	80	23,3	11,9	11,4	1,84
8	12	7	70	18,7	8,5	10,2	1,10
9	6	8	44	10,9	4,9	6,0	1,54
Tutte	407	407	52	16,5	8,7	7,8	1,02

TAB. 5 - ELIMINAZIONE DELL'ARRESTO DI CRESCITA POST-SVEZZAMENTO, ASSOCIATA ALLA VACCINAZIONE CON ANTIGENI DI E. COLI SOMMINISTRATI NELL'ALIMENTO

	N. aziende	N. figliate	N. suini	Incremento ponderale Kg/Kg		
				Da 14 gg. allo svezzamento	Dallo svezzamento a 55 gg.	Da 14 gg. a 56 gg.
Vaccino *	10	114	1061	5,72	6,30 **	12,03 **
Placebo	10	114	1101	5,41	5,49	10,91
% Differenza	Vaccino * > Placebo			+5,69%	+14,78% **	+10,27% **

* Vaccino prodotto nel nostro laboratorio con *E. coli* inattivati.

** Differenza significativa ($P < 0,05$).

BIBLIOGRAFIA

1) ADINOLFI M., GLYN A.A., LINSAY M. and MILNE C.M. (1966): Immunology, *10*, 517.
2) ALLEN W.D. (1980): PhD. Thesis, Open University.
3) ALLEN W.D., and PORTER P. (1977): Immunology, *32*, 819.
4) ALLEN W.D., SMITH C.G., and PORTER P. (1973): Immunology, *25*, 55.
5) ANDRE C., HEREMANS J.F., VAERMAN J.P. and CAMBIASO C.L. (1975): Journal of Experimental Medicina, *142*, 1509.
6) ASHERSON G.L., ZEMBALA M., PERERA M.A.C.C., MAYHEW B. and THOMAS W.R. (1977): Cellular Immunology, *33*, 145.
7) BALJER G. (1980): Proceedings, International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, p. 162.
8) BALJER G., CHORMERR S., PLANK H., BOSTEDT H., SCHELS H. and MAYR A. (1976): Zentralblatt für Veterinärmedizin B., *23*, 364.
9) BARFOD K. (1980): Proceedings, International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, p. 164.
10) BARRATT M.E.J. and PORTER P. (1979) Journal of Immunology, *123*, 676.
11) BARRATT M.E.J., STRACHAN P.J. and PORTER P. (1978): Clinical and Experimental Immunology, *31*, 305.
12) BIENFNSTOCK J. and BEFUS A.D. (1981): Immunology *41*, 249.
13) BRANDTZAEG P. (1974): Immunology, *26*, 1101.
14) CHAPMAN H.A., JOHNSON J.S. and SOOPER M.D. (1974): Journal of Immunology, *112*, 555.
15) CHASE M.W. (1946): Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, *61*, 257.
16) CHIDLOW J.W. and PORTER P. (1978): Research in Veterinary Science, *24*, 254.
17) CHIDLOW J.W. and PORTER P. (1979): Veterinary Record, *104*, 496.
18) DZIABA K.A., SZYNKIEWICZ Z.M., BINEK M. and JAKUBOWSKI T. (1980): Proceedings, International Pig Veterinary Society Congress, Copenhagen, p. 165.
19) EVANS D.G., SILVER R.P., EVANS D.J., CHASE D.G. and GORBACH S.L. (1975): Infection and Immunity, *12*, 656.
20) EVANS P.A., NEWBY T.J., STOKES C.R., PATEL D. and BOURNE F.J. (1980): Scandinavian Journal of Immunology, *11*, 419.
21) HALL J.G. and ANDREW E. (1980): Immunology Today, *1*, 100.
22) HEREMANS J.F. (1974): The Antigens. Vol. II (M. Sela, ed.) p. 365.
23) HILL I.R. and PORTER P. (1974): Immunology, *26*, 1239.
24) KOHLER E.M., CROSS R.D. and BOHL E.H. (1975): American Journal of Veterinary Research, *36*, 757.
25) LINDH E. (1975): Journal of Immnuology, *114*, 284.

26) LINGOOD M.A. and INGRAM P.L. (1978): Research in Veterinary Science, *25*, 113.
27) LINGOOD M.A. and PORTER P. (1978): Immunology, *35*, 125.
28) LINGOOD M.A., ELLIS M.L. and PORTER P. (1979): Immunology, *38*, 125.
29) LINGOOD M.A. and PORTER P. (1980): In Microbial Adhesion to Surfaces (Berkley R.C.W., Lynch J.M., Melling J., Rutter P.R. and Vincent B., eds.) p. 441 Ellis Horwood, ltd., Chichester.
30) MCCLELLAND D.B.L., SAMSON R.R., PARKIN D.M. and SHEARMAN D.J.C. (1972): Gut, *13*, 450.
31) MOON H.W. (1974): Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine, *18*, 179.
32) OWEN R.L. (1977): Gastroenterology, *72*, 440.
33) PARRY S.H. and PORTER P. (1978): Immunology, *34*, 41.
34) PEPPARD J., ORLANS E., PAYNE A.W.R. and ANDREW E. (1981): Immunology, *42*, 83.
35) PIERCE N.F. and KOSTER F.T. (1980): Journal of Immunology, *124*, 307.
36) PORER P., NOAKES D.E. and ALLEN W.D. (1972): Immunology, *23*, 299.
37) PORTER P., KENWORTHY R., NOAKES D.E. and ALLEN W.D. (1974a): Immunology, *27*, 841.
38) PORTER P., KENWORTHY R. and ALLEN W.D. (1974b): Veterinary Record, *95*, 99.
39) PORTER P., LINGOOD M.A. and CHIDLOW J.W. (1978): In: Secretory Immunity and Infection, p. 133. Ed McGhee J.R., Mestecky J. and Babb J.L. Plenum Publ. Corp.
40) PORTER P., PARRY S.H. and ALLEN W.D. (1977): In: Immunology of the Gut, p. 55. Ciba Foundation Symposium New Series, *46*, Amsterdam: Excerpta Medica.
41) PORTER P., KENWORTHY R., HOLME D.W. and HORSFIELD S. (1973): Veterinary Record, *92*, 630.
42) REYNOLDS J., GYURE L., ANDREW E. and HALL J.G. (1980): Immunology, *39*, 463.
43) SAIF L.J., BOHL B.J. and GUPTA R.V.P. (1972): Infection and Immunity, *6*, 600.
44) SMITH H.W. and LINGOOD M.A. (1971): Journal of Medical Microbiology, *4*, 467.
45) STOKES C.R., NEWBY T.J. HUNTLEY J.M., PATEL D. and BOURNE F.J. (1979): Immunology, *38*, 497.
46) STROBLER W., RICHMAN L.K. and ELSON C.O. (1981): Immunology Today, *2*, 156.
47) UNDERDOWN B.J. and DORRINGTON K.J. (1974): Journal of Immunology, *112*, 949.
48) WALKER W.A. (1981): Immunology Today, *2*, 30.

B. BALJER, W. EICHHORN e P.A. BACHMANN *

IMMUNOPROFILASSI DELLE INFEZIONI DA E. COLI NEI VITELLI

E. coli è causa di almeno due frequenti malattie dei vitelli: l'infezione setticemica e l'infezione enterotossica.

Queste forme differiscono nei caratteri di virulenza e nella patogenesi dell'*E. coli* causale. Finora non conosciamo molto circa i fattori di virulenza dei ceppi setticemici, mentre i meccanismi di patogenicità dei ceppi enterotossici bovini sono ben definiti come enterotossina termostabile determinata da plasmidi e fattori di colonizzazione (fimbrie) per l'adesione all'epitelio dell'intestino tenue.

A causa dell'elevata antibiotico-resistenza dei ceppi bovini di *E. coli*, il controllo delle infezioni nei vitelli è oggi sempre più basato sull'immunoprofilassi. I vitelli possono essere immunologicamente protetti contro le infezioni da *E. coli* in due modi:

1) con l'immunità trasmessa attraverso il colostro e il latte in seguito a vaccinazione delle madri (immunità lattogena);
2) con immunizzazione attiva per via orale.

Dapprima considereremo il potenziale delle diverse classi di antigeni di *E. coli* per lo sviluppo dei vaccini per il bovino (tabella 1).

La componente polisaccaridica (endotossina, lipopolisaccaride) della parete cellulare è chiamata antigene O. È noto che l'antigene O è proteggente nel bovino. Tuttavia, a parte la loro capacità protettiva, la potenzialità dei vaccini basati sull'antigene O è limitata dall'esistenza di numerosi antigeni somatici di *E. coli* (circa 164) e dall'appartenenza dei ceppi setticemici o enterotossici a vari gruppi O. Questo problema può essere superato con vaccini contenenti alcuni dei più comuni antigeni O dei ceppi patogeni per il vitello o con vaccini stabulogeni (contenenti l'antigene O del ceppo isolato in campo). L'antigene O è altamente immunogeno, proteggente e facile da produrre.

* Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Ludwig Maximilians Universität. Tierärztliche Facultät - München, Deutschland.

Gli antigeni capsulari (K) e flagellari (H) svolgono un ruolo minore nella produzione di vaccini per le colibacillosi del bovino. Questo non significa che tali antigeni non siano assolutamente proteggenti, ma fino ad oggi non ci sono risultati conclusivi sulla loro capacità protettiva. L'efficacia dei vaccini basati sugli antigeni flagellari è limitata perché molti ceppi bovini di *E. coli* non sono mobili (non producono flagelli).

Inoltre sono presenti fra i ceppi patogeni per il vitello molti tipi di antigeni H e K.

I pili o fimbrie (proteina K) sono piccole appendici filamentose non flagellari di *E. coli*. I ceppi enterotossici devono possedere tipi particolari di pili per essere virulenti. I pili sono antigenici; quelli fino ad oggi implicati nella colonizzazione dell'intestino del vitello da parte di *E. coli* enterotossici sono di un solo tipo antigene e sono denominati K 99.

Il K 99 è universalmente diffuso e fino ad oggi tutti i ceppi enterotossici isolati che hanno dimostrato di colonizzare l'intestino producono il K 99. Questo antigene è immunogeno e può fornire una ampia protezione. Tuttavia sembra probabile che esistano in natura ceppi enterotossici patogeni per il vitello che non producono l'antigene K 99. Gli *E. coli* patogeni per il vitello K 99 negativi producono forse altri tipi di antigeni di pili che facilitano la colonizzazione. Se è così, è necessario aumentare il numero di ceppi contenuti nei vaccini per includere, per una completa protezione, questi pili non ancora identificati.

L'immunità nei confronti dell'enterotossina è una meta logica per lo sviluppo dei vaccini contro i ceppi enterotossici di *E. coli*. Quasi tutti i ceppi enterotossici del vitello finora conosciuti producono però la tossina termostabile, che è un peptide non (o poco) antigenico. Perciò l'ostacolo maggiore allo sviluppo di vaccini anti-enterotossina è la mancanza di antigenicità della tossina ST. Sembra probabile che questo ostacolo possa essere superato in futuro con la manipolazione immunochimica dell'ST, ad esempio coniugandola con altri antigeni.

Riassumendo, allo stato attuale delle conoscenze solo l'antigene somatico O e l'antigene K 99 sono le migliori basi antigeni per la vaccinazione contro i ceppi enterotossici patogeni per il vitello.

Nel controllo delle infezioni da *E. coli* nei vitelli neonati gioca

un ruolo importante il passaggio di anticorpi dalla madre alla prole tramite il colostro e il latte.

Condizione preliminare per questa immunità passiva è la presenza continua di anticorpi specifici in quantità sufficiente nell'intestino tenue (per i ceppi enterotossici) o nel siero (per i ceppi setticemici).

La protezione è sostenuta dagli anticorpi del latte, la cui produzione e secrezione può essere stimolata dalla vaccinazione in gravidanza delle bovine. Molti gruppi hanno dimostrato che la vaccinazione delle bovine gravide può proteggere i vitelli da un challenge con *E. coli* patogeno nel periodo dell'allattamento.

La figura n. 1 riassume le diversità dei profili delle immunoglobuline durante la lattazione nel bovino e nel suino. La composizione percentuale delle classi di immunoglobuline nel colostro bovino e suino è simile. In entrambe le specie circa l'80% dell'intero contenuto in immunoglobuline è costituito da IgG_1. Nei ruminanti la situazione delle immunoglobuline del latte non è altrettanto favorevole che nel suino; infatti il latte bovino contiene IgA, i più importanti anticorpi secretori, solo nella percentuale del 17% sul totale delle immunoglobuline. L'immunoglobulina principale nel latte bovino è l'IgG_1 (66%) derivata dal siero. Un recettore specifico per le IgG_1 è responsabile del passaggio selettivo di IgG_1 dal siero alla mammella durante la lattazione. Inoltre una grande quantità di pièce secretorie libere non legate è presente nel latte bovino. La produzione di anticorpi nella mammella del bovino diminuisce rapidamente entro 2-3 giorni dal parto. Tuttavia nei ruminanti è presente una connessione intestino-mammella, costituita dalla migrazione di linfociti sensibilizzati dalle placche di Peyer alla ghiandola mammaria nelle ultime fasi di gravidanza e durante la lattazione. Malgrado la particolare situazione immunologica durante la lattazione bovina, dati recenti mostrano che la secrezione di anticorpi attraverso il colostro e il latte può essere aumentata e prolungata nel bovino con l'inoculazione parenterale di antigene K 99 e antigene somatico O. Per una significativa stimolazione della secrezione di anticorpi devono essere osservate le seguenti condizioni:

1) le bovine devono essere stimolate localmente nel tratto intestinale durante l'infezione con agenti enteropatogeni;

2) i vaccini devono essere somministrati due volte (per via sottocu-

tanea o intramuscolare) durante gli ultimi 3 mesi di gravidanza, ad un intervallo di 20-28 gg;

3) i vaccini devono contenere una grande quantità di antigene ed essere adiuvati.

A Monaco abbiamo recentemente messo a punto un vaccino associato *E. coli*+*Rotavirus* per la vaccinazione delle madri. Poiché la diarrea neonatale dei vitelli è di eziologia complessa, la vaccinazione delle madri per stimolare il contenuto di anticorpi nel latte dovrebbe mirare alla protezione anche contro i virus enteropatogeni. La preparazione del nostro vaccino è basata su un antigene K 99 parzialmente purificato e complessi *Rotavirus*/anticorpi a cui sono stati aggiunti idrossido d'alluminio e olio o saponina (tabella n. 2).

La figura n. 2 riassume la risposta anticorpale nei confronti dell'antigene K 99 nel latte delle bovine vaccinate, misurata col metodo ELISA. La vaccinazione ha stimolato titoli molto alti nel siero del colostro, in confronto ai controlli non vaccinati. Questi livelli di anticorpi colostrali diminuivano lentamente durante i 21 gg. del periodo di osservazione, ma rimanevano significativamente più alti che nei controlli.

Nella figura n. 3 sono riassunti i titoli degli anticorpi anti-*rotavirus* nel colostro e nel latte di quattro differenti gruppi di bovine. Nel gruppo 1 e 2, di controllo, i soggetti hanno ricevuto solo materiale cellulare o terreno di colture cellulari con adiuvanti; il gruppo 3 ha ricevuto solo antigene *rotavirus* e il gruppo 4 complessi *Rotavirus*/anticorpi con adiuvanti. Come si vede dal diagramma nei due gruppi di controllo c'è stata una diminuzione molto rapida del titolo anticorpale nel latte: 7 giorni dopo il parto il titolo era inferiore a 1:10. Dopo vaccinazione con antigene *rotavirus* puro si sono osservati titoli un po' più alti, fra 1:12 e 1:18, mentre le bovine vaccinate con vaccino adiuvato presentavano un titolo anticorpale nel latte significativamente più elevato che negli altri 3 gruppi: il titolo si manteneva a 1:40 fino a 21 gg. dopo il parto.

Con la separazione gel-cromatografica del colostro del gruppo 1 abbiamo trovato anticorpi anti-*rotavirus* nel picco delle IgA e nel gruppo 2 nei picchi delle IgA e delle IgG. Il latte del 7° e del 10° giorno post-partum non conteneva anticorpi anti-*rotavirus* (figure 4 e 5). Nel gruppo 3 gli anticorpi anti-*rotavirus* erano presenti anche

nelle classi IgA e IgG. Nel latte del 7° e 21° giorno post-partum abbiamo misurato bassi titoli di anticorpi della classe IgG (fig. 6). Solo nel gruppo 4 sono stati trovati titoli anticorpali significativi nel colostro e nel latte dei giorni 7 e 21. Gli anticorpi del colostro appartenevano alle classi IgA, IgG e IgM, quelli del latte soltanto alle IgG (fig. 7).

La tabella n. 3 mostra i risultati preliminari delle nostre prove di vaccinazione finora eseguite. Le vaccinazioni sono state effettuate negli allevamenti A, B e C,scelti per aver avuto alte percentuali di diarrea neonatale nei vitelli durante gli ultimi anni e per esservi stati isolati regolarmente *rotavirus* ed *E. coli* enterotossici K 99. In questa tabella vengono confrontate le situazioni cliniche nei vitelli neonati prima e durante la vaccinazione; durante il programma di vaccinazione una bovina su cinque è stata inoculata con un placebo.

Nell'allevamento A erano nati 35 vitelli nell'anno precedente la vaccinazione, di cui 25 erano stati colpiti da grave diarrea e 10 erano morti. A partire dal dicembre 1981 sono state vaccinate le bovine: dei 13 vitelli nati da madri vaccinate solo 2 hanno presentato diarrea, mentre nel gruppo di controllo si sono ammalati 2 vitelli su 4. In entrambi i gruppi non si è avuta mortalità e non si sono isolati né *rotavirus* né *E. coli* enterotossici dalle feci dei vitelli ammalati.

Nell'allevamento B dall'ottobre 1980 al marzo 1981 erano nati 30 vitelli, di cui 24 avevano presentato diarrea grave e 4 erano morti. Nel dicembre 1981 abbiamo iniziato la vaccinazione delle bovine gravide. 3 vitelli dei 15 nati da madri vaccinate hanno presentato diarrea, ma nessuno è morto. Nel gruppo di controllo 9 vitelli hanno avuto grave diarrea e uno è morto; in 5 casi abbiamo isolato *rotavirus* e in 3 casi ceppi di *E. coli* K 99 negativi ma positivi all'emoagglutinazione mannosio-resistente.

Nell'allevamento C la situazione clinica prima della vaccinazione era la seguente: di 227 vitelli neonati 143 avevano presentato diarrea e 19 erano morti. Dei 111 vitelli nati da madri vaccinate solo 18 hanno presentato diarrea, mentre di 19 vitelli del gruppo di controllo 9 hanno avuto diarrea e uno è morto. Tutti i campioni di feci erano negativi per *rotavirus* ed *E. coli* enterotossici.

Nella figura 8 sono riassunti i nostri risultati preliminari di vaccinazione. Il tasso di diarrea nei gruppi non vaccinati o vaccinati con

un placebo era del 50-55%, mentre nel gruppo vaccinato il tasso medio era solo del 12%.

I nostri risultati indicano che l'immunizzazione delle bovine contro *E. coli* potrà essere un metodo efficace in futuro per ridurre l'incidenza della diarrea neonatale nei vitelli. L'immunizzazione delle madri ha il vantaggio che gli antigeni *E. coli* possono essere associati con altri, per esempio virali. Al contrario dei vaccini contenenti antigeni O di *E. coli*, i vaccini K 99 coprono più ceppi enterotossici. D'altra parte l'efficacia dell'immunità materna dipende da un'assunzione sufficiente di latte e colostro; inoltre la preparazione di vaccini per le madri richiede alti standard tecnologici.

L'altro metodo di controllo vaccinale, cioè l'immunizzazione attiva per via orale dei vitelli neonati, non presenta questi svantaggi. Le nostre esperienze con l'immunizzazione orale, finora fondate su oltre 50.000 vaccinazioni, indicano che la vaccinazione orale attiva contro le infezioni da *E. coli* è un metodo molto importante di controllo delle colibacillosi nel vitello.

Per avere significato, l'immunoprofilasssi contro le infezioni da *E. coli* nei vitelli deve coprire anche nei primi giorni di vita. La somministrazione frequente del vaccino orale, consistente solo di batteri inattivati al calore, è relativamente facile perché può essere effettuata col latte o con sostituti del latte.

La figura 9 mostra un riassunto dei dati clinici di vitelli di allevamenti problema dopo la vaccinazione orale con placebo e con vaccini orali contenenti ceppi stabulogeni di *E. coli.*

Dopo somministrazione di un placebo a 100 vitelli abbiamo osservato in più di 50 soggetti grave diarrea dovuta a ceppi enterotossici di *E. coli,* e 8 sono morti. Dopo somministrazione ai vitelli di vaccini orali stabulogeni sono scomparsi gli episodi di diarrea grave. Solo in 18 soggetti abbiamo osservato leggera diarrea.

Nella figura 10 sono riassunti i tassi di diarrea e di mortalità dopo vaccinazione di 5000 vitelli di 100 allevamenti diversi. Prima dell'inizio del programma vaccinale, il tasso di diarrea grave era di circa il 75% e il tasso di mortalità del 24% circa. Dopo l'inizio della vaccinazione è quasi scomparsa la diarrea grave seguita da mortalità, mentre non è stato possibile prevenire circa il 20% dei casi di diarrea leggera, che duravano comunque non più di 1-2 giorni. Con l'uso di

un vaccino polivalente contenente gli antigeni dei più frequenti gruppi O dei ceppi enterotossici di *E. coli* nel vitello, abbiamo osservato un tasso di diarrea grave del 20% durante il periodo 1974-76.

Malgrado questa situazione relativamente favorevole, negli anni 1976-77 l'uso del vaccino polivalente non ha portato a risultati soddisfacenti; pur avendo aggiunto altri antigeni O al vaccino il tasso di protezione è stato solo del 50%.

La figura 11 mostra in dettaglio i risultati del programma di vaccinazione orale nell'allevamento S. in A. La vaccinazione orale era impiegata irregolarmente dal 1972. Nel mese precedente l'introduzione della vaccinazione tutti i vitelli neonati erano morti per grave diarrea sostenuta da ceppi enterotossici di *E. coli*. Fu isolato un ceppo appartenente al sierogruppo O 111; il vaccino contenente tale ceppo protesse tutti i vitelli nati in seguito dalla diarrea colibacillare. Tutti i vitelli non vaccinati, ad eccezione dei nati nell'estate 1973, si ammalarono di grave diarrea. La vaccinazione con vaccino polivalente non contenente il sierotipo O 111 non diede alcuna protezione.

Nell'allevamento L. in G. quasi tutti i vitelli si ammalarono con diarrea grave entro la prima settimana, prima dell'introduzione della vaccinazione. 50 vitelli vaccinati con il ceppo stabulogeno (O 34) non si ammalarono; tuttavia alla fine del 1976, malgrado la vaccinazione, si ebbero altri casi di diarrea. Il ceppo enterotossico isolato non apparteneva più al sierotipo O 34 ma all'O 73. Sostituendo nel vaccino il vecchio ceppo con l'O 73 i vitelli vaccinati rimasero sani (figura 12).

Riassumendo si possono trarre le seguenti conclusioni dalle nostre ricerche sull'immunizzazione orale dei vitelli neonati contro le infezioni da *E. coli*:

1) Gli esiti favorevoli sono dimostrabili solo dopo 10 vaccinazioni giornaliere nei primi 10 giorni di vita con almeno 10^{10} *E. coli* inattivati al calore.

2) La protezione dopo vaccinazione orale può essere dimostrata dal 2° giorno di vita. È difficile pensare che un'immunità locale attivamente indotta sia in grado di svolgere un ruolo così presto nel neonato e a così breve tempo dalla vaccinazione. I risultati di una conta di germi nella mucosa intestinale dopo infezione da *E. coli* in soggetti vaccinati e non indica una possibile competizione fra *E. coli* inattivati e vivi nei confronti dei recettori della mucosa del piccolo intestino.

3) La protezione offerta da questo vaccino è fortemente specifica per il sierotipo O; la O - specificità mostra che la protezione precoce non è effetto solo dell'incremento dei meccanismi di resistenza aspecifica.

4) L'immunità passiva lattogena non interferisce con l'immunizzazione attiva.

Tutte queste caratteristiche del vaccino orale ne hanno fatto un mezzo importante e pratico nel controllo delle diarree del vitello negli ultimi anni.

TAB. 1 - QUADRO DEI DIVERSI ANTIGENI DI E. COLI

Antigene	Localizzazione	Effetto immunogeno	Struttura chimica	Numero
O	Parete cellulare (endotossina)	Gruppo specifico	polisaccaride	164 circa
	Parete cellulare (neurotossina)	Uniforme	lipoproteina?	1
K	Capsula	Tipo specifico	polisaccaride	71 circa
	Pili (fimbrie)	Tipo specifico	proteina	6 circa
H	Flagelli	Tipo specifico	proteina	56 circa
LT	Enterotossina (termolabile)	Uniforme	proteina	1
ST	Enterotossina (termostabile)	Uniforme meno immunogena	polipeptide	1
M	Capsula mucosa	Uniforme meno immunogena	polisaccaride	1

TAB. 2 - COMPOSIZIONE DEL VACCINO ROTAVIRUS/K 99

1. Complessi *Rotavirus*/anticorpi
2. Antigene K 99 (semipurificato)
3. Adiuvante
   ($Al(OH)_3$, emulsione olio in acqua, saponina)

Volume: 5 ml

Inoculazione: intramuscolare

Periodo di vaccinazione: 4 settimane prima del parto
e 1 giorno dopo il parto

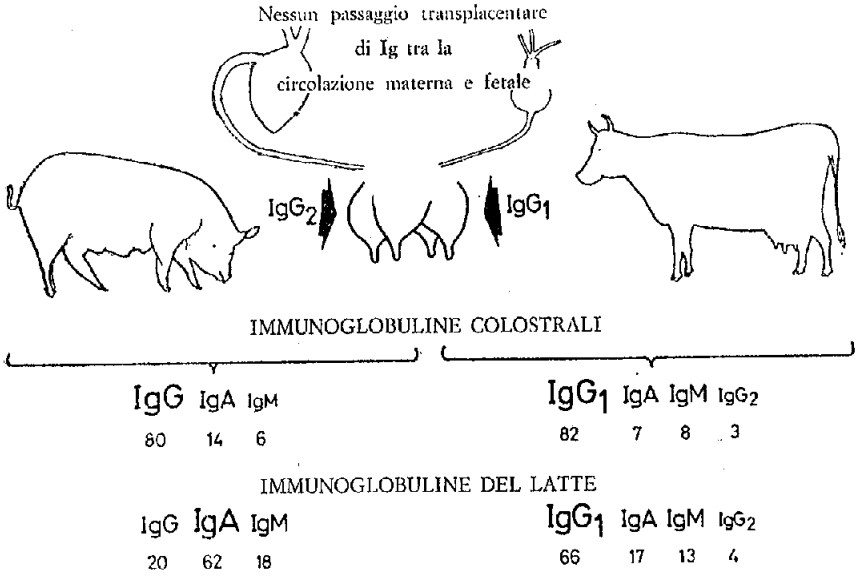


FIG. 1 - Caratteristiche differenziali dei profili immunoglobulinici nella lattazione del bovino e del suino, indicanti le composizioni percentuali delle classi di immunoglobuline nel colostro e nel latte.

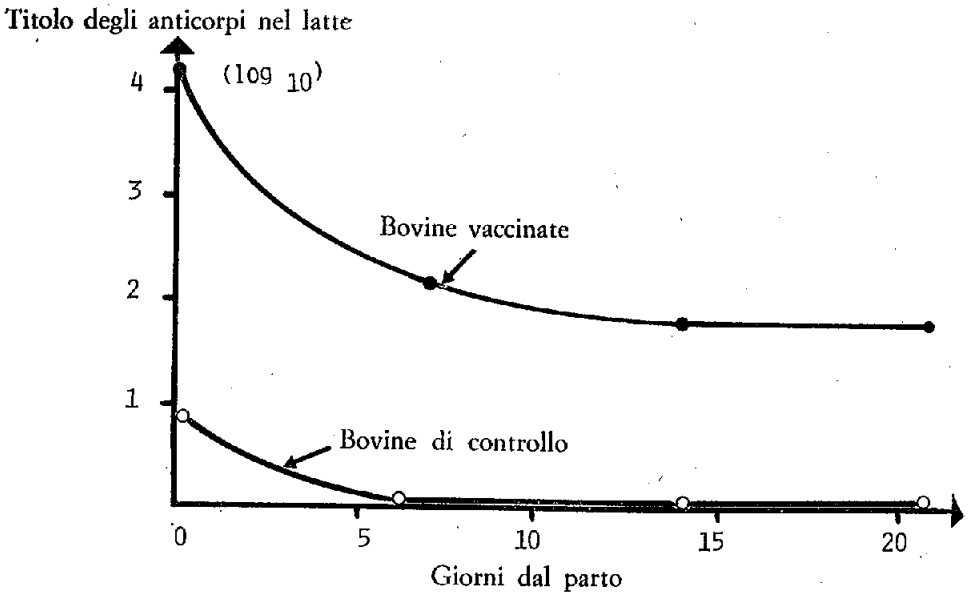


FIG. 2 - Titoli degli anticorpi anti-K 99 nel colostro e nel latte di bovine durante i primi 21 giorni di lattazione, determinati col metodo ELISA.

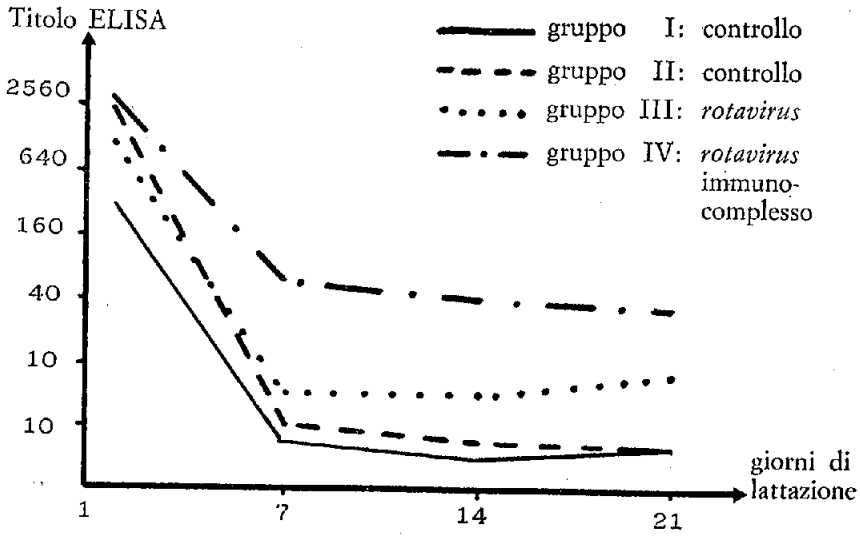


FIG. 3 - Confronto dei titoli degli anticorpi anti-*Rotavirus* nel colostro e nel latte di bovine vaccinate e non vaccinate.

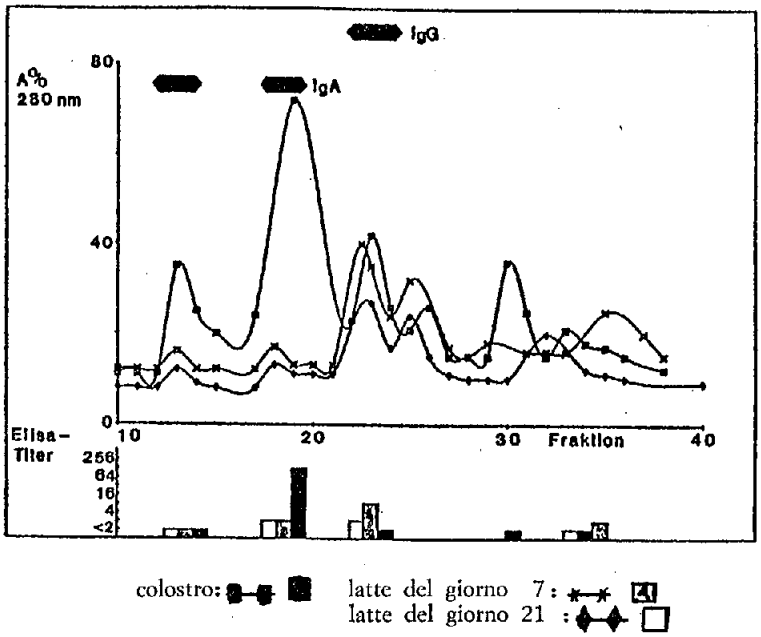


FIG. 4 - Separazione gel-cromatografica del colostro e del latte dei giorni 7 e 21 di bovine inoculate con materiale cellulare (controlli).

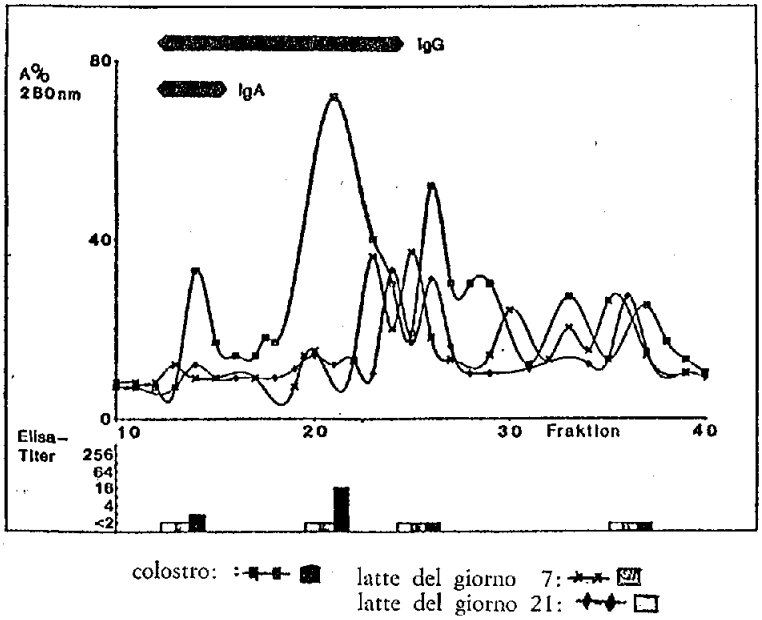


FIG. 5 - Separazione gel-cromatografica del colostro e del latte dei giorni 7 e 21 di bovine inoculate con terreno di colture cellulari e adiuvante (controlli).

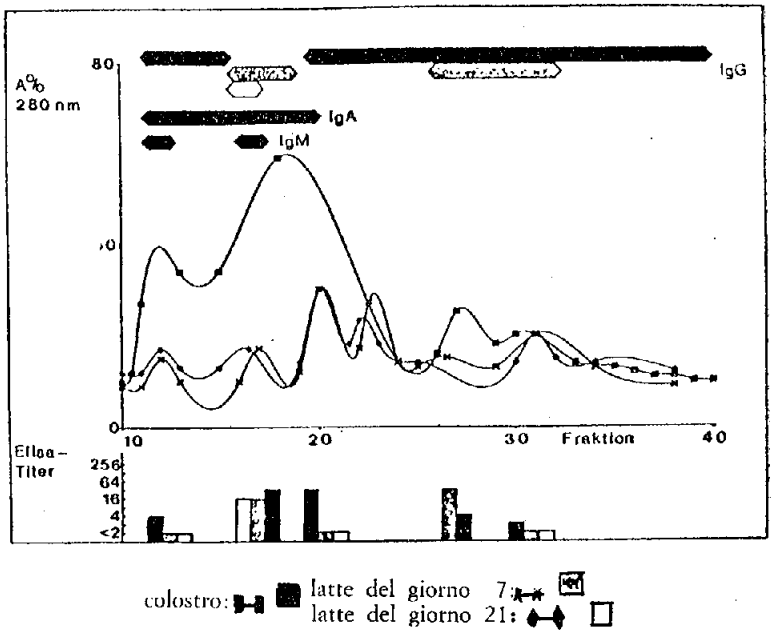


FIG. 6 - Separazione gel-cromatografica del colostro e del latte dei giorni 7 e 21 di bovine inoculate con antigene *rotavirus*.

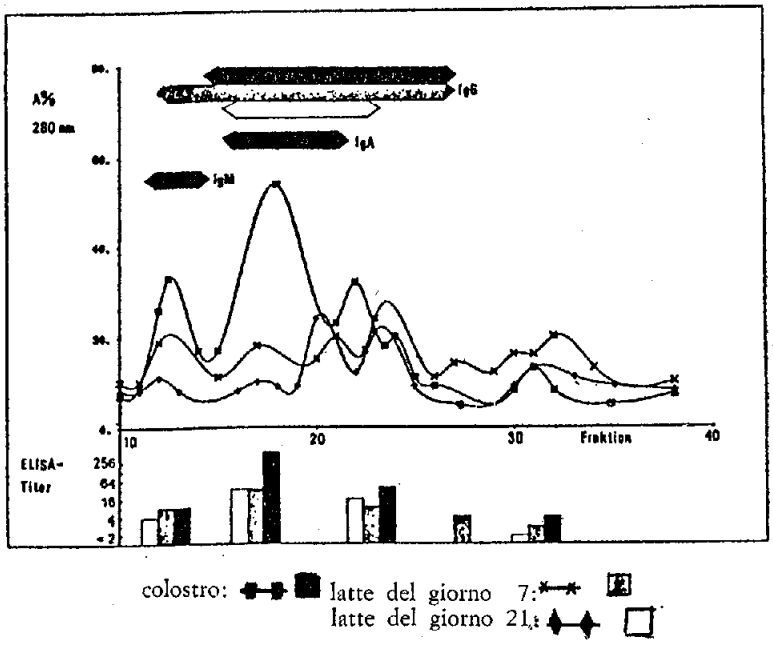


FIG. 7 - Separazione gel-cromatografica del colostro e del latte dei giorni 7 e 21 di bovine inoculate con complessi *Rotavirus*/anticorpi e adiuvanti.

TAB. 3 - SITUAZIONE CLINICA IN ALLEVAMENTI DOPO VACCINAZIONE DELLE BOVINE GRAVIDE CONTRO ROTAVIRUS ED E. COLI K 99

allevamento	situazione dei vitelli	numero di animali (periodo di osservazione)		
			dopo la vaccinazione	
		prima della vacc.	*Rota*/K99-Vacc.	Placebo-Vacc.
A	nati	35 (10.80 - 9.81)	13 (12.81 -)	4 (12.81 -)
	con diarrea	25	2	2
	morti	10	—	—
B	nati	30 (10.80 - 3.81)	15 (12.81 -)	3 12.81 -)
	con diarrea	24	3	2
	morti	4	1	—
C	nati	277 (11.79 - 11.81)	116 (11.81 -)	19 (11.81 -)
	con diarrea	143	18	9
	morti	19	—	1

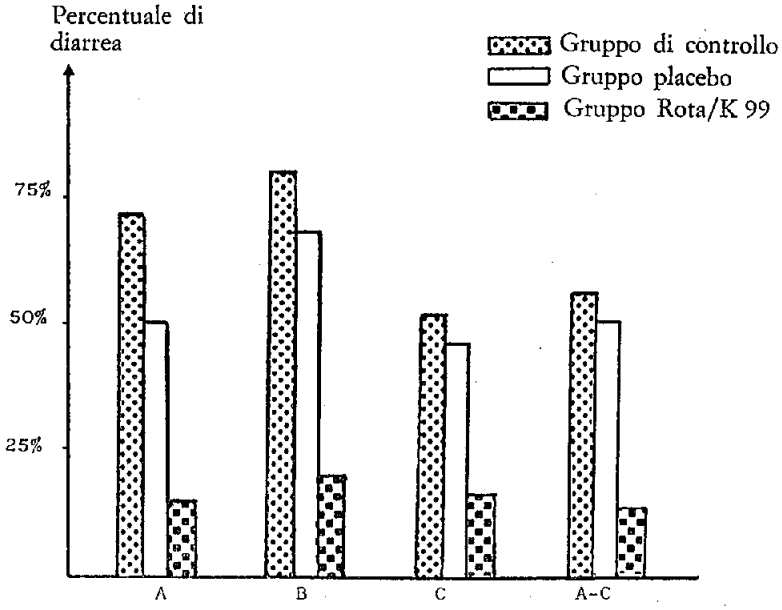


FIG. 8 - Percentuali di vitelli con diarrea, nati da bovine vaccinate o non vaccinate (*Rota*/K 99 o placebo).

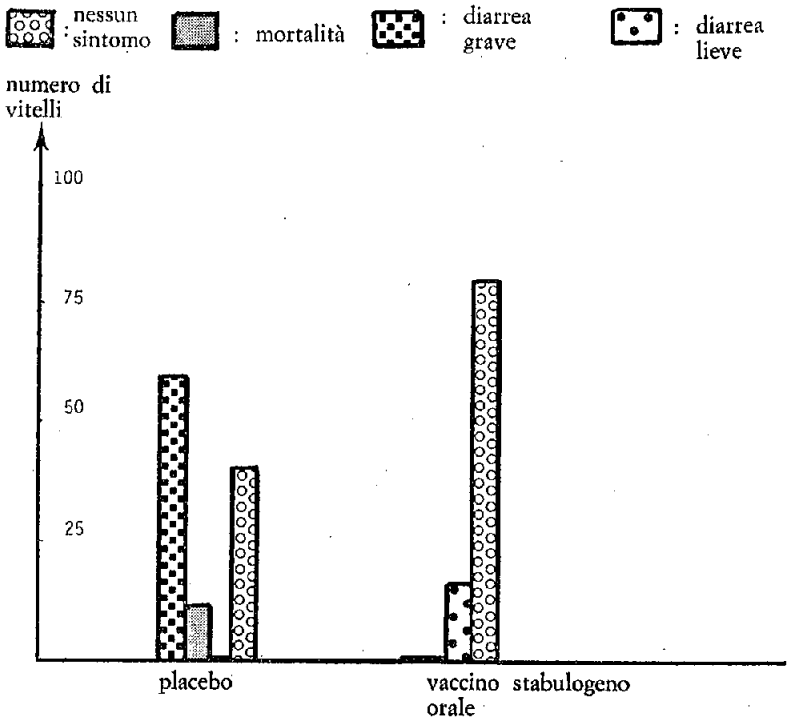


FIG. 9 - Quadro clinico dopo vaccinazione orale con placebo e vaccino *E. coli* orale stabulogeno.

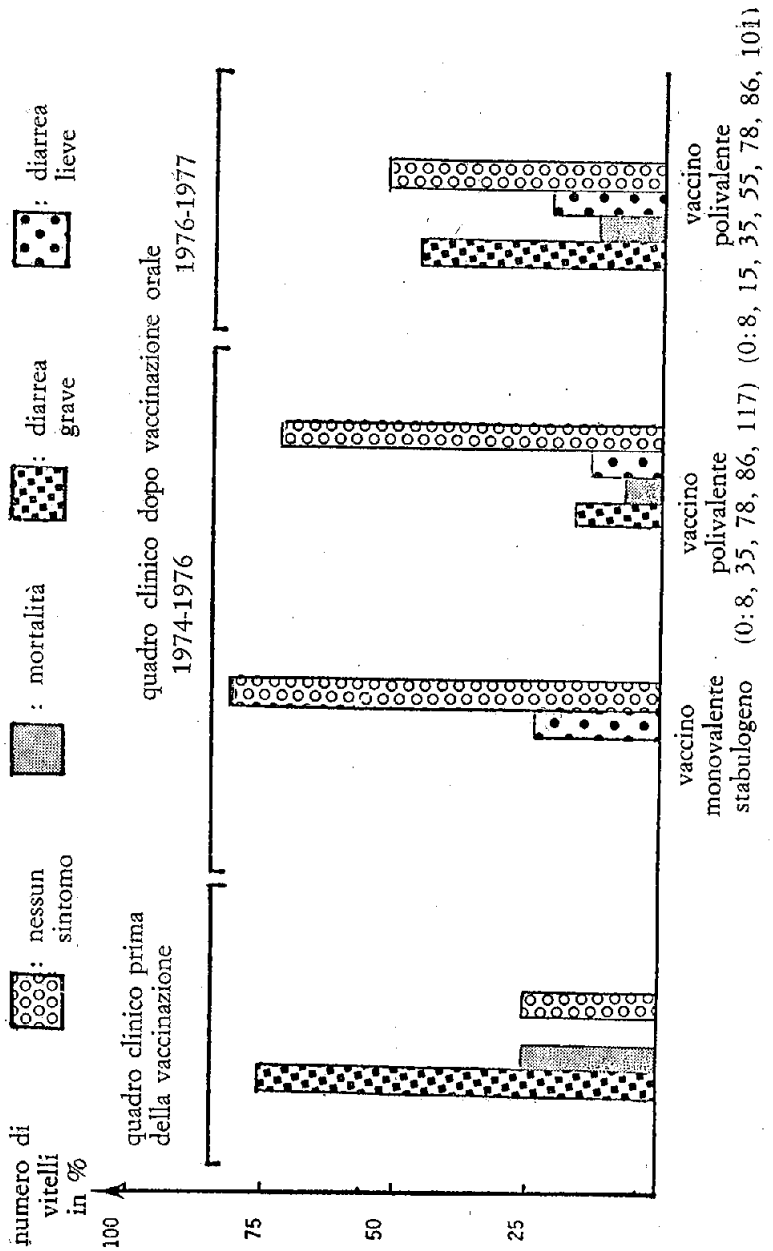


FIG. 10 - Quadro dell'efficacia di vari vaccini *E. coli* orali in vitelli di allevamenti problema.

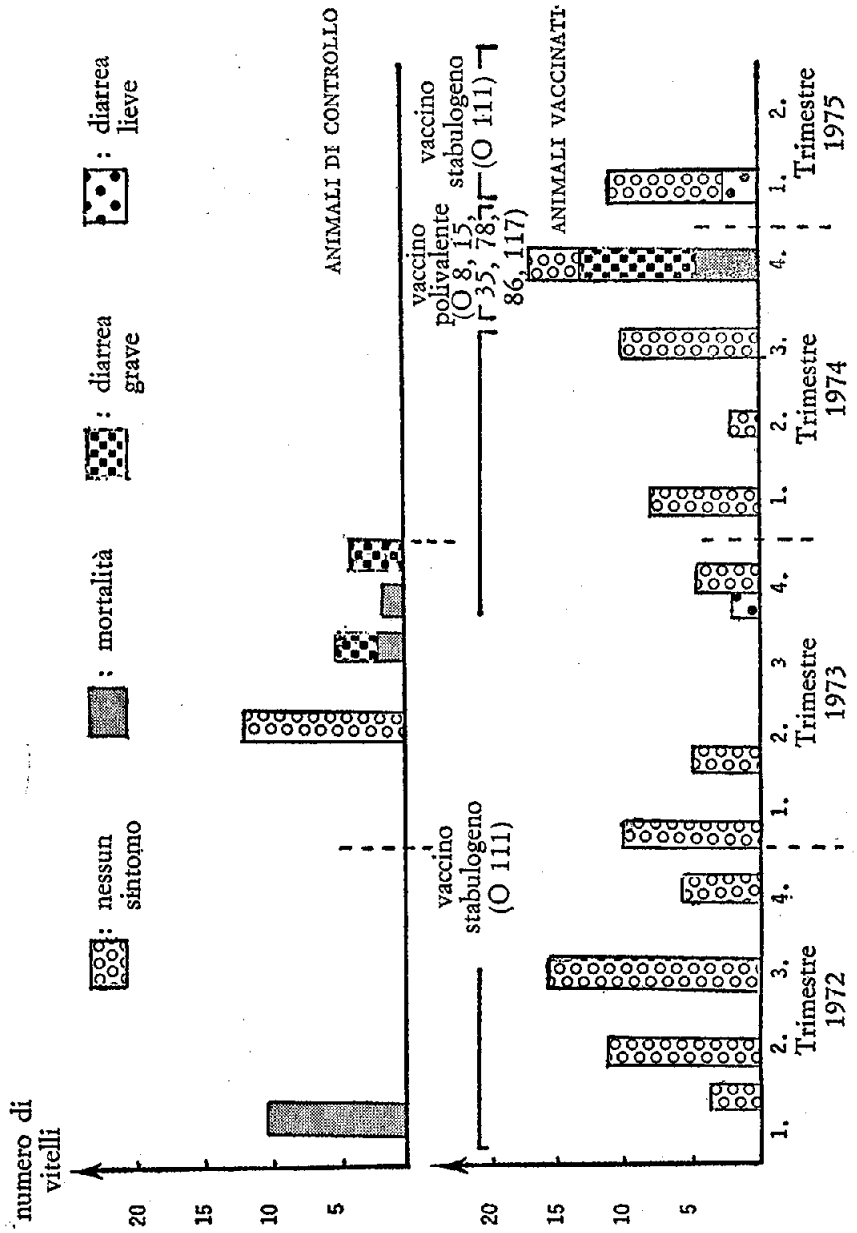


FIG. 11 - Efficacia del vaccino *E. coli* orale nell'allevamento S. in A. durante un periodo di osservazione di 3 anni.

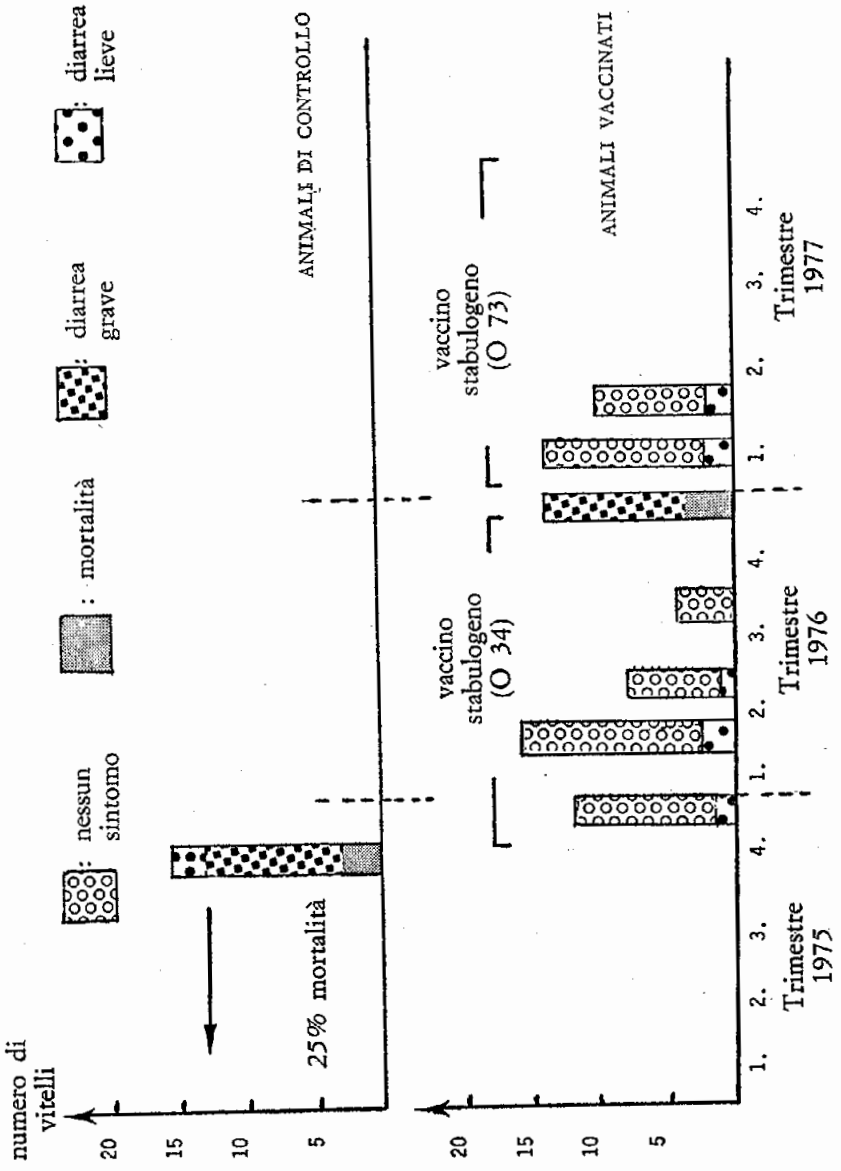


FIG. 12 - Efficacia del vaccino *E. coli* orale nell'allevamento L. in G. durante un periodo di osservazione di 2 anni.

DISCUSSIONE PARTE SECONDA

P. Acone

Abbiamo sentito parlare di immunizzazione dei bovini con trattamenti fatti con vaccini a base sia di rotavirus che di coli. I vitelli sono stati immunizzati per via orale e al proposito vorrei chiedere se i ceppi che sono stati usati erano ceppi specifici dell'ambiente oppure ceppi isolati in altre occasioni.

G. Baljer

Per l'immunizzazione per via orale del vitello si possono usare solo antigeni O di *E. coli*; non si può immunizzare con l'antigene K99 e il *Rotavirus,* anche se taluni l'hanno provato; in generale si può asserire che tale sistema non funziona. Si hanno pertanto a disposizione 2 metodi. Il primo consiste nell'immunizzazione per via orale del vitello anti *E. coli* enterotossici con antigeni O l'altro consiste nell'immunizzazione delle bovine madri con il vaccino abbinato K99+ *Rotavirus* o *Coronavirus*. Bisogna considerare che ci sono molti gruppi O di *E. coli* enterotossici, e non possiamo produrre un vaccino polivalente, contenente tutti gli antigeni O o tutti gli *E. coli* enterotossici. La cosa migliore è pertanto ricercare i sierotipi O presenti nell'azienda, in modo da poter decidere quale tipo di vaccino produrre.

P. Porter

Per quanto riguarda le difficoltà che si riscontrano nel vaccinare per via orale contro il *Rotavirus* si tenga presente che mentre è possibile produrre facilmente grandi quantità di antigeni batterici da som-

ministrare per via orale, per quanto riguarda i virus, non abbiamo a tutto oggi la capacità di produrre di routine grandi quantità di antigene. Non appena la tecnologia del DNA ricombinante avrà compiuto sufficienti progressi, sarà possibile sfruttare la via orale anche per gli antigeni virali.

G. Conedera

Mi sembra che dalla letteratura risulti che gli antigeni O non inducono anticorpi di tipo protettivo. Mi risulta pertanto difficile comprendere perché il Dr. Baljer ha usato ceppi con antigeni come O 117, 55, 15 che non mi paiono essere ceppi tra quelli che comunemente intervengono in queste forme. Si è indagato forse sulla presenza di determinati fattori di virulenza in questi ceppi? C'è dubbio per ciò che riguarda gli anticorpi nei confronti degli antigeni capsulari, è certa la risposta agli antigeni da pili, ma qual è la protezione indotta dagli antigeni O?

G. Baljer

Non sono d'accordo che l'antigene O non sia protettivo. Esso è altamente immunogeno e protettivo. Non conosco le fonti bibliografiche della collega, ma so che è sicuramente protettivo. Per quanto riguarda la composizione del nostro vaccino, esso è specifico solo per la Baviera; se si volesse un analogo vaccino per l'Italia, si dovrebbe ricorrere ad un'altra composizione. Porter ha già detto che per la vaccinazione per via orale ci vogliono grandi quantità di antigene. Non è possibile ad esempio produrre grandi quantità di enterotossine ed inoltre nel vitello la enterotossina ST non è o è poco immunogena. Non è possibile inoltre vaccinare oralmente col K99, sempre per la stessa ragione, cioè che non è facile produrne grandi quantità.

P. Porter

Vorrei esprimere un commento sul concetto di «anticorpo protettivo». La cosidetta funzione protettiva si riferisce a un test in vivo,

dove i batteri sono iniettati per via endovenosa od intraperitoneale. Si ha a che fare cioè con l'attività protettiva dell'immunità sistematica, basata sugli anticorpi Ig G. Su questa interferisce la membrana capsulare, che esercita un fenomeno di blocco verso gli anticorpi anti O. Quando si passa al lume intestinale, si tratta di effetti a lungo termine. Non si ha a che fare infatti con elevate dosi infettanti per via sistematica e gli antigeni O, in assenza di antigeni capsulari, sono assai idonei a stimolare un'immunità protettiva. Nel lume intestinale gli anticorpi anti O hanno l'effetto di eliminare il K88; non si possono perciò fare paragoni con una protezione sistemica, basata su un modello che non ha alcuna relazione con quello naturale. Bisogna invece considerare cosa accade sulla superficie dell'epitelio intestinale; in questo caso gli anticorpi anti O sono protettivi.

M. Amadori

Recentemente ho letto che Barta e collaboratori dell'Università della Louisiana, hanno dimostrato chiaramente come l'attività battericida naturale del siero, non dopo stimolazione antigenica, si esprime al massimo nei confronti di quei ceppi di coli che più facilmente possono perdere gli antigeni K e rivelare antigenicamente l'antigene somatico O.

G. Hess

Qual è l'influenza degli anticorpi di tipo Ig M di provenienza materna sulla formazione della risposta immunitaria specifica del soggetto dopo lo svezzamento?

P. Porter

Due tipi principali di anticorpi possono essere trasportati dal siero materno al colostro: sono le immunoglobuline Ig G, che rappresentano circa l'80% degli anticorpi nella madre e le Ig M, che rap-

presentano circa il 6% degli anticorpi nella madre; in più c'è una certa quota di Ig A. Il problema è se gli anticorpi materni sono capaci di interferire con la risposta immunitaria attiva del neonato. Le Ig G, passate dalla madre alla progenie, sono soppressive; le Ig M invece sono stimolanti. Se pensate alle proporzioni rispettive degli anticorpi nel siero e considerate le risposte primarie e secondarie, si ha che le Ig M dominano normalmente le risposte primarie e le Ig G quelle secondarie; in tutte queste risposte esiste una regolazione, da parte dei linfociti T. Le Ig M costituiscono la prima parte della risposta; la risposta prosegue poi con la produzione di Ig G. È già stato affermato che nel neonato che riceve Ig G non si ha una risposta ma si ha una soppressione. La funzione dello schema di vaccinazione della scrofa di cui si è riferito nella relazione è di generare anticorpi Ig M, e di rafforzare le risposte naturali del neonato all'ambiente. Se si vuole andare oltre ed immunizzare il neonato con lo stesso vaccino si ottiene un effetto di rafforzamento della risposta e ciò è molto importante. Baljer ha menzionato il fatto che gli anticorpi materni non pregiudicano la possibilità di vaccinare la progenie per via orale; questo è vero per il tratto intestinale. È però importante che le classi di anticorpi non siano soppressive, o che almeno operino nel lume e non nella circolazione sistematica. In tal caso è meglio avere Ig M. Bisogna ricordare inoltre che le Ig G hanno una semi-vita nel siero di 15-19 giorni, le Ig M di 2-8 giorni, le Ig A di 2 giorni. Uno dei meccanismi messo in luce negli ultimi anni è il trasporto epatico; le Ig A, sia in forma secretoria che in forma dimerica non secretoria, sono eliminate molto rapidamente dalla circolazione ematica, a patto che posseggano la catena J. La loro capacità soppressiva è perciò molto bassa. Non abbiamo alcun riscontro di attività soppressiva, né nel bovino (dove sono assorbite molte Ig A secretorie), né nel suino, bensì riscontriamo un effetto benefico delle Ig A trasportate alle mucose. Esse rafforzano passivamente la protezione mucosale.

G. Gagliardi

Mi risulta che all'estero siano in circolazione vaccini fatti con «soli pili» oppure «con pili». Stando a quello che abbiamo sentito oggi chiedo qual è il vero valore protettivo di questi vaccini. Inoltre,

qual è il valore reale dell'antigene capsulare considerato che per molti altri germi tipo pasteurelle l'antigene capsulare ha un'azione fondamentale nella produzione dell'immunità?

G. Baljer

Per quanto riguarda gli antigeni capsulari polisaccaridici, siamo a conoscenza di prove di vaccinazione delle bovine condotte negli U.S.A. È stata descritta una buona protezione, ma non posso dire di più, poiché non ho alcuna esperienza personale.

P. Porter

Mi risulta che i vaccini a base di pili non sono un trucco commerciale. Ciò che è indesiderabile per i vaccini a base di pili è che siano usati con la tradizionale tecnologia vaccinale, che porta alla produzione della classe di anticorpi non idonea. La conseguenza di ciò, che si sta ora evidenziando, è che tali vaccini costituiscono uno strumento di controllo della malattia nei primi stadi. In seguito si hanno però dei problemi perché i batteri nell'ambiente cambiano. C'è uno studio assai pregevole, condotto con un vaccino anti K 88, col quale è stato dimostrato che l'enterite neonatale veniva controllata in forma molto soddisfacente; ora però vi è il problema grave dell'enterite post-svezzamento. Dove si aveva una forma K 88-dipendente di enterite neonatale, vi è ora una forma K 88-dipendente di enterite post-svezzamento. Nel complesso la sindrome si è spostata dal periodo neonatale allo svezzamento. È ciò che si verifica in Olanda, dove si vedono meno ceppi K 88, ma più ceppi K 99 o 987 P e, per quanto riguarda la forma post-svezzamento, si tratta ora di una forma K 88-dipendente. Ciò non è dovuto al vaccino di per sé, ma alla tecnologia vaccinale, che porta a produrre anticorpi Ig G; il che non è desiderabile.

A. Mazzeo

Vorrei sapere se è possibile controllare le sindromi sostenute da

E. coli attraverso l'attivazione di un sistema naturale antimicrobico del latte quale il sistema della lattoperossidasi.

P. Porter

Risulta chiaramente che, in relazione ai modelli di infezione che abbiamo esaminato, tutti i meccanismi non specifici cui ci si può rivolgere per la protezione naturale (latto-perossidasi, lattobacilli, barriera acida ecc.) sono inefficaci quando mancano gli anticorpi. Non dico che non portino un contributo all'azione degli anticorpi nella protezione globale; gli anticorpi sono però necessari nell'immunità del soggetto molto giovane.

M. Amadori

Recentemente alcuni autori belgi hanno riportato che la semplice inoculazione di adiuvanti acqua in olio contenenti idrossido di alluminio possono stimolare di per sé, senza la presenza dell'antigene, la secrezione di anticorpi nel colostro, anche anticorpi-*rotavirus*. Volevo sapere quale è l'opinione del Dr. Baljer al proposito.

G. Baljer

Come si può vedere dai nostri risultati, avevamo dei controlli che ricevevano solo adiuvante o solo terreno per colture cellulari. In essi non osservammo mai effetti benefici legati all'azione del solo adiuvante.

S. Pascucci

Vorrei chiedere al Dr. Porter qualche indicazione sulla profilassi della Malattia degli Edemi, e se ritiene utile a tal fine l'uso di vaccini stabulogeni spenti e con adiuvante incompleto di Freund.

Con la vaccinazione per via orale che abbiamo impiegato, in più del 50% dei casi non abbiamo avuto successo contro la malattia degli edemi. Penso che sia dovuto al fatto che non sappiamo ancora quali devono essere i principi attivi per immunizzare contro tale malattia. Nel vaccino che ho descritto usavamo 2 ceppi correlati alla malattia degli edemi: con l'O 141 ne avevamo spesso il controllo, con l'O 139 no. Perciò non siamo in una posizione di forza, dal punto di vista della tecnologia di vaccinazione per via orale. Anch'io sono a conoscenza del lavoro, presentato in Olanda, riguardante l'adiuvante acqua-in-olio, che è inoculato per via intraperitonale alla dose di 1 ml. Non riesco a capire come questa tecnica possa produrre qualcosa di specifico per il controllo della malattia degli edemi. Mi è stato riferito che ha un alto livello di efficacia, ma non sono in grado di esprimere un'opinione personale certa.

D. GALASSI

CONCLUSIONI DEL MODERATORE

Concludere un dibattito non è mai semplice: tanto più in una giornata come questa, in cui è stato dimostrato — se ce n'era ancora bisogno — che la colibacillosi è un argomento aperto e suscettibile di vari sviluppi, con problemi complessi di ordine eziologico, profilattico e terapeutico. Concludere significa operare per sintesi e la sintesi presuppone delle scelte. Cercherò, in questa evenienza, di effettuare le mie scelte con la mentalità del pratico che opera nella realtà dell'allevamento intensivo. Forse sarò giudicato severamente dai ricercatori, usi ad approfodire teorie, spesso affascinanti, ma che hanno poca probabilità di applicazione nel corso del prossimo quinquennio.

Abbiamo però delle necessità impellenti: se queste non verranno subito soddisfatte con la determinazione necessaria, si rischia di far cadere molte delle speranze riposte nell'allevamento intensivo degli animali da reddito.

La tipizzazione sierologica dei ceppi di *E. coli* coinvolti in sindromi enterotossiche dei suini e dei vitelli deve essere approfondita. I dati forniti da GUINÉE per quel che riguarda la realtà olandese e quelli raccolti in Italia da NIGRELLI e CONEDERA sono tali da far riflettere. Abbiamo la sensazione che i Colibacilli costituiscano un'entità microbica proteiforme, non totalmente chiarita, da seguire con cura, come si fa con altre Enterobatteriacee, per es. con le Salmonelle.

La sintesi delle enterotossine è codificata da plasmidi e questi possono essere trasmessi per coniugazione da un ceppo all'altro di *E. coli.* Ciò fa supporre che i rapporti tra sierotipi e potere enterotossico non sono fissi: in futuro potrebbero comparire altri sierotipi dotati di attività enterotossica. Il quadro potrà essere definito con rapidità, anche nelle regioni italiane, se altri Laboratori si associeranno al lavoro di tipizzazione in corso presso gli Istituti Zooprofilattici di Brescia e di Padova.

La diarrea neonatale dei vitelli dovrà essere affrontata per quello che è: una sindrome complessa in cui *E. coli* enterotossici sono spesso coinvolti, ma non sono i soli agenti presenti e, in alcuni casi, nemmeno i più importanti.

Le ricerche riferite da HESS sono eloquenti: in molti casi i *Rotavirus* o altri agenti virali giocano un ruolo importante, primario, nell'eziologia delle diarree neonatali. In questi casi forse è tuttora valido indicare i colibacilli quali agenti d'irruzione secondaria. Comunque la mancata assunzione di colostro, oppure una ritardata o insufficiente somministrazione dello stesso, giocano un ruolo determinante nell'insorgenza della diarrea neonatale.

A scopo profilattico sembra pertanto logico insistere sulla somministrazione precoce, ripetuta e prolungata del colostro materno. I vitelli potranno così usufruire di anticorpi già pronti, notevolmente concentrati, specie se le bovine saranno state vaccinate, durante la gestazione, con vaccini bivalenti contenenti sia *Rotavirus* che antigene capsulare K 99 di *E. coli*. I risultati delle prove riferite da BALJER sono dimostrative: la vaccinazione delle bovine gravide con vaccino bivalente *Rotavirus*-K99 ha ridotto drasticamente sia la morbilità che la mortalità dei vitelli neonati.

La vaccinazione per via orale dei vitelli neonati, con Colibacilli inattivati al calore, concentrati e somministrati giornalmente per i primi 10 giorni di vita, sembra fornire anch'essa risultati soddisfacenti. Gli animali sono protetti dall'infezione già al 2°-3° giorno dalla somministrazione del vaccino purché questo corrisponda all'antigene somatico dell'*E. coli* patogeno presente nell'allevamento.

Anche per la specie suina la profilassi della colibacillosi neonatale mediante vaccini somministrati per via orale sembra fornire risultati validi. Le prove riferite da PORTER sono molto chiare. La protezione dei suinetti dalle diarree colibacillari neonatali, mediante assunzione di colostro ricco di anticorpi, indica che l'intestino riveste un ruolo preminente nel sistema immunitario. Per questa ragione sembra logico dover attuare la vaccinazione orale che, oltretutto, sembra anche capace di mantenere un naturale equilibrio tra l'ospite e la sua flora microbica.

Per la terapia qualche idea nuova è stata abbozzata nel corso della discussione. È chiaro ormai che i trattamenti antibiotici e chemioterapici non sono più in grado di assicurare notevoli probabilità di successo nelle sindromi colibacillari dei giovani animali. Tuttavia, secondo quanto prospettato anche in questa sede, sarebbe estremamente imprevidente divulgare nella pratica dei presidi terapeutici

che non abbiano superato favorevolmente tutti i severi collaudi del Laboratorio.

A chiusura della riunione il moderatore ha il dovere di porgere il suo ringraziamento a tutti i partecipanti, ai Relatori, a coloro che nella discussione hanno portato i loro dubbi, la loro esperienza, i problemi del loro ambiente.

Questo mio dovere viene compiuto con estremo piacere: ritengo che le relazioni e gli interventi che esse hanno suscitato siano stati interessanti ed abbiano chiarito molti dei nostri dubbi. A questo proposito devo un ringraziamento ad AMADORI che ha svolto in maniera egregia la funzione di traduttore. La sua preparazione tecnica ha consentito una fedele traslazione dei concetti dall'una all'altra lingua.

Infine, anche a nome di tutti i partecipanti, desidero indirizzare un sincero grazie ed i più vivi complimenti alla Scuola per la Ricerca Scientifica che ha voluto questa proficua Giornata di Studio, all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia e alla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche che ci hanno signorilmente ospitati e hanno curato l'organizzazione.

Finito di stampare
da La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia
nel febbraio 1984