UNIVERSITA' DI MILANO
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

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:

"CHICK ANEMIA" ED INFEZIONI ENTERICHE VIRALI NEI VOLATILI

BRESCIA, 23 GIUGNO 1989

24

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:
"CHICK ANEMIA"
ED INFEZIONI ENTERICHE VIRALI NEI VOLATILI

Nella stessa Collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da «Escherichia coli» degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
13 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
14 - 1985 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi. Problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura. Tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa

UNIVERSITA' DI MILANO
Facoltà di Medicina Veterinaria

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE
Scuola per la Ricerca Scientifica

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:

"CHICK ANEMIA" ED INFEZIONI ENTERICHE VIRALI NEI VOLATILI

BRESCIA, 23 GIUGNO 1989

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - Novembre 1989

Stampa: La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia

INDICE

G. MANDELLI
Presentazione p. 9

J.B. MC FERRAN
Recenti acquisizioni sull'agente dell'anemia del pulcino p. 13

G. MEULEMANS
Importanza degli enterovirus nella sindrome da malassorbimento del pollo p. 17

D. REYNOLDS
Ricerche sull'enterite virale del tacchino p. 47

S. PASCUCCI, D. GELMETTI, G. SIRONI, A. LAVAZZA
Sindromi enteriche virali dei volatili da reddito: esperienze di campo e rilievi di microscopia elettronica p. 55

Discussione p. 87

Le traduzioni sono state curate dalle dott.sse M. Ferrari e M.N. Losio dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Brescia e dal dott. A. Massone, allievo della Scuola per la Ricerca Scientifica della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche.

Si ringraziano per la collaborazione il dott. P. Bergonzini ed il sig. G.F. Spalenza.

MODERATORE

G. MANDELLI
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università di Milano

RELATORI

J.B. MC FERRAN
Veterinary Research Laboratories, Stortmont, Belfast

G. MEULEMANS
National Institute for Veterinary Research
Brussels

DON REYNOLDS
Veterinary Medical Research Institute
College of Veterinary Medicine Iowa

S. PASCUCCI*; D. GELMETTI*; G. SIRONI**, A. LAVAZZA*
*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia - Brescia
**Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e
Patologia Aviare Facoltà di Veterinaria - Università di Milano

PRESENTAZIONE

In modo più mirato questa premessa potrebbe intitolarsi "la ragione delle scelte", cioè un commento sul "perché" e sul "per chi" della presente giornata di studio dedicata ad alcune problematiche della moderna Patologia aviaria. Se ho preferito mantenere il più generico termine di "presentazione" è perché questo consente una discussione un po' più allargata sugli argomenti che formano l'oggetto dell'odierno convegno. Resta comunque inteso che la breve introduzione affidatami per aprire i lavori del convegno verte essenzialmente sul "perché" e sul "per chi" più sopra accennati.

Dunque, nella presente giornata di studio sono insiti tre tipi di scelte: scelta delle problematiche da trattare; scelta dei relatori cui affidare la trattazione degli argomenti; scelta della sede in cui svolgere il dibattito, che è anche scelta geo-economica e riconoscimento di meriti acquisiti sul campo.

Cominciamo con il primo "perché": scelta delle problematiche da trattare. Fondamentale ed ovvio presupposto della riuscita di un'assise scientifica è quello di mettere all'ordine del giorno temi di comune interesse ed attualità. Per la nostra giornata di studio parrebbe, a prima vista, che tale obiettivo sia stato completamente mancato: se il lettore ha occasione di compiere frequenti visite ad allevamenti avicoli intensivi, sia nel nostro che in altri paesi, egli sa bene quanto sia difficile trovare dei pulcini colpiti da "anemia" e, se cerca gruppi di broiler con precoci forme di "enterite", di queste ne troverà certamente, ma per lo più non causate da agenti virali.

Lo stesso capiterebbe a chi avesse modo di praticare allevamenti avicoli rurali: essi sono una miriade, ma si celano nel nostro contesto zootecnico come una rete invisibile. I loro problemi sanitari sono in parte uguali, in parte diversi rispetto a quelli dell'allevamento intensivo, ma comunque il visitatore non scoprirebbe traccia delle malattie in questione.

Ed ancora: se il lettore cercasse nei moderni trattati di Patologia aviaria la sindrome "chick anemia" od un articolato capitolo dedicato alle virosi enteriche dei volatili, rimarrebbe probabilmente assai deluso constatando la scarsità di spazio dedicato a questi argomenti e potrebbe

inoltre rilevare le situazioni di equivoco che si creano in rapporto alle suddette denominazioni (maggiore utilizzo dell'espressione "malabsorption syndrome", ancora carico di dubbi eziopatogenetici, per le poche forme enteriche neonatali ufficialmente riconosciute; ampia trattazione dedicata ad enteriti virali di tutt'altro significato, quali "l'enterite emorragica" del tacchino e "l'enterite (peste) dell'anatra" ecc.).

Ritorna quindi l'interrogativo in precedenza posto a proposito delle scelte di questo convegno: obiettivo mancato?

No, l'obiettivo è giusto e le tematiche in discussione sono pienamente attuali. Occorre però qualche spiegazione: in primo luogo va tenuto presente che, nella moderna avicoltura (quella degli allevamenti intensivi, per intendersi!), le classiche malattie infettive, quali pseudopeste, laringo-tracheite infettiva, diftero-vaiolo, colera, pullorosi ecc., indubbiamente figurano ancora, ma sono spesso insidiosamente "sfumate". Accanto a queste malattie si è fatta strada, e tende a prevalere per danni economici provocati, una nuova serie di infezioni, tutte caratterizzate da scarsa patogenicità degli agenti causali e da scarso o nullo rilievo clinico, ma tutte capaci di "minare" subdolamente l'efficienza fisiologica dei volatili allevati. Alcune di esse incidono sulla capacità di reazione immunitaria degli animali (la "chick anemia" è una di queste), altre rallentano la crescita e riducono le attività produttive (tra queste troviamo alcune virosi enteriche neonatali e giovanili), altre ancora compromettono l'efficienza dell'apparato respiratorio e di altri importanti organi (bronchite infettiva del pollo, rino-tracheite infettiva del tacchino) ovvero quella dell'apparato muscolo-scheletrico (tenosinovite virale del pollo). Quasi tutti risentono negativamente della eccessiva spinta impressa all'organismo dalle moderne tecnologie produttive e tutte suscitano, a loro volta, un'interminabile sequela di eventi patogeni secondari. Di alcune di queste malattie i trattati parlano poco, vuoi perché i relativi agenti causali sfuggono alle routinarie tecniche di indagine microbiologica e perciò si conoscono poco, vuoi perché i corrispondenti quadri anatomo-clinici sono spesso assai modesti o addirittura del tutto silenti. Tuttavia queste malattie esistono, creano ingenti danni economici e sono, anzi, una dimostrazione concreta e palpabile delle difficoltà che insidiano, da ogni lato, i moderni allevamenti intensivi. Per tali motivi si è ritenuto utile, nella presente giornata di studio, individuare alcune di queste malattie, scelte tra le più

emblematiche, e sottoporle ad una accurata puntualizzazione.

Il discorso della puntualizzazione ci porta direttamente al secondo ordine di scelte: quello che riguarda i relatori. Su questo argomento non è il caso di spendere molte parole. Sono stati chiamati a partecipare al convegno valenti studiosi, italiani e stranieri, che nella sperimentazione conoscitiva della 'chick anemia" e delle enteriti virali dei giovani volatili hanno acquisito benemerenza e fama su scala internazionale. In particolare, il Prof. Mc Ferran è noto in tutto il mondo per le ricerche sue e del suo gruppo sugli adenovirus aviari, sulla sindrome da malassorbimento del pollo ed, ultimamente, sugli herpesvirus dei mammiferi. Il Prof. Meulemans ed i suoi collaboratori hanno condotto negli ultimi anni assidue ed interessantissime prove sulla patogeneticità dei virus enterici dei volatili. Il Prof. Reynolds ha sviluppato decisivi studi sulla patologia intestinale dei giovani tacchini in Nord-America e sul complesso di fattori che sta alla base di tale fenomeno. Il Prof. Pascucci è stato certamente tra i primi ad occuparsi di enteriti virali dei volatili, oltre ad essere un profondo conoscitore dei maggiori problemi speculativi e pratici della moderna Patologia aviaria.

Circa la scelta della sede, questa è stata fatta *in primis* per venire incontro alle esigenze dei veterinari, dei tecnici e degli imprenditori che operano nel "triangolo avicolo" dell'Italia settentrionale, triangolo che, essendo costituito da Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna, riconosce in Brescia una delle sue più intraprendenti comunità attive. Si è tenuto inoltre in doverosa considerazione l'insostituibile ruolo di stimolo, di promozione e di sostegno svolto, sia in generale che nel caso particolare, dalla locale Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, che qui ancora una volta sentitamente ringraziamo, nonché il prezioso ruolo di ricerca sperimentale ed applicata ed ancora di assistenza sanitaria a favore degli allevatori che il potente Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e le Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università italiana da tempo svolgono nell'area sopra menzionata.

Mi sia consentito, infine, di rivolgere un saluto ed un ringraziamento ai componenti della Società Italiana di Patologia Aviare, benemerito sodalizio scientifico che proficuamente opera nel contesto nazionale ed è qui in modo assai ampio ed al più alto livello rappresentato. A tutti i convenuti auguro una proficua giornata di studio, assicurando che nel

mio ruolo di moderatore cercherò di... disturbare il meno possibile lo svolgimento dei lavori. Tenterò, insomma, di comportarmi come i buoni arbitri delle partite di foot-ball, dei quali - quando sono veramente bravi - nessuno avverte la presenza in campo!

G. Mandelli

M.S. Mc Nulty; D. Todd and J.B. Mc Ferran

RECENTI ACQUISIZIONI SULL'AGENTE DELL'ANEMIA DEL PULCINO

Veterinary Research Laboratories, Stortmont,
Belfast BT4 3SD, Northern Ireland

La presenza di anticorpi nei riguardi del virus responsabile dell'anemia nei pulcini (CAA) è stata evidenziata in una notevole percentuale di allevamenti avicoli del Regno Unito mediante l'impiego della reazione di immunofluorescenza indiretta. Ricerche sulla trasmissione verticale della immunità hanno indicato che gli anticorpi acquisiti passivamente scendono a livelli irrilevabili dopo circa 3-4 settimane mentre la sieroconversione viene riscontrata a 8-9 settimane; a circa 20 settimane il 90% degli animali presenta anticorpi. Non sono state evidenziate immunoglobuline specifiche in campioni di siero di sangue di tacchini o anitre ed inoltre tacchini di un giorno di età, inoculati per via intramuscolare non hanno presentato né anemia né sieroconversione.

Ricerche eseguite in allevamenti di pulcini SPF in Francia, Olanda, Germania Occidentale, Regno Unito, Australia e Stati Uniti d'America, hanno evidenziato come molti di essi fossero infetti con il virus della CAA. Questi allevamenti erano produttori di uova per scopi sperimentali come per la produzione di uova per l'allestimento di vaccini.

L'epidemiologia e la patogenesi dell'agente dell'anemia del pulcino non sono state ancora chiarite. È noto che il virus, provvisto di notevole resistenza, viene trasmesso con le uova ed eliminato con le feci. Non è d'altra parte noto se esistano portatori sani dell'infezione come non è altresì noto se il virus possa persistere in forma latente e possa essere riattivato ed eliminato periodicamente durante la vita dell'animale.

Nel Regno Unito, in due occasioni, abbiamo isolato il virus responsabile della CAA da broilers affetti da sindrome da malassorbimento «runting/stunting» ed un ceppo di questo virus è stato isolato

negli Stati Uniti da broilers con la necrosi dell'ala. Questi stipiti furono ottenuti inoculando il materiale patologico di campo in pulcini sensibili ed isolando successivamente il virus, dal fegato e dal timo degli stessi, in cellule MDCC MSB1.

L'isolamento del virus della CAA in detta linea cellulare necessita di 9-10 passaggi seriali.

Questi stipiti furono tipizzati sulla base della capacità di sviluppo nelle cellule MSB1, delle correlazioni antigeniche (determinate in reazioni crociate di immunofluorescenza) con l'agente dell'anemia del pulcino isolato a Cuxshaven, della resistenza al cloroformio ed al calore e della capacità di indurre anemia ed alterazioni istopatologiche tipiche in pulcini sperimentalmente infettati. Tutti i ceppi isolati causavano anemia nella maggior parte dei pulcini sensibili di un giorno di vita, quando venivano inoculati per via intramuscolare, mentre gli animali a contatto non contraevano l'infezione. Nei pulcini di 7 giorni di età gli stipiti isolati nel Regno Unito e negli Stati Uniti d'America causavano anemia rispettivamente nel 15-20%e nel 50% dei soggetti inoculati. Simili differenze di virulenza sono state riscontrate da Yuasa e Imai in Giappone. Tutti gli stipiti isolati nel Regno Unito, Stati Uniti d'America, Germania e Giappone, in prove di siero neutralizzazione crociata sono risultati appartenere allo stesso sierotipo. Da ciò si deduce l'esistenza di un solo sierotipo.

In seguito alla messa a punto di metodi di purificazione del virus della CAA, sono stati allestiti anticorpi monoclonali nei riguardi dello stipite Cux-1 e la valutazione degli ibridomi fu eseguita mediante la reazione di immunofluorescenza indiretta. Si identificarono oltre 30 ibridomi produttori di anticorpi nei riguardi delle cellule MSB1 infettate con il virus della CAA. Alcuni di questi furono sottoposti a clonaggio ed inoculati nei topi. Il liquido ascitico raccolto presentava 3 diversi tipi di colorazione:

1. Colorazione nucleare lieve e granulare;
2. Rilevanti inclusioni intranucleari;
3. Colorazione indefinita diffusa.

Gli anticorpi monoclonali con comportamento descritto come riportato al punto 1, potevano essere suddivisi fra quelli specifici nei riguardi dello stipite Cux-1 e quelli che reagivano nei confronti di tutti

gli stipiti isolati presi in esame. Gli anticorpi monoclonali che si comportavano come riportato al punto 3 reagivano con più cellule rispetto a quelli con il comportamento riportato ai punti 1 o 2. Soltanto gli anticorpi monoclonali che presentavano il tipo di colorazione riportato al punto 2 reagivano, nella reazione western blots, con materiale proveniente dalle cellule MSB1 infette. Detti anticorpi monoclonali sono stati impiegati per:

1. identificare strutture nelle cellule MSB1 infette mediante colorazione con oro colloidale;

2. allestire un antigene evidenziabile con la reazione ELISA che ha semplificato la messa a punto o perfezionato i metodi di purificazione del virus della CAA;

3. messa a punto della reazione ELISA per la evidenziazione di anticorpi nei riguardi del virus della CAA in campioni di sieri di pulcini.

I primi tentativi di perfezionamento della reazione ELISA mediante adsorbimento delle piastre con il virus della CAA parzialmente purificato non ebbero successo. Tuttavia quando venne impiegato, a tale scopo, un anticorpo monoclonale adsorbito alle piastre e, come antigene il virus della CAA ottenuto da cellule MSB1 la prova diede esito positivo. Nella nostra routine i sieri vengono posti a contatto con l'antigene alla diluizione di 1:1000 e la reazione immunologica è evidenziata mediante l'impiego di anti-globulina di pollo coniugata alla perossidasi estratta dal rafano. È stato riscontrato che i risultati alla reazione di immunofluorescenza indiretta ed all'ELISA sono simili.

L'acido nucleico estratto da preparazioni parzialmente purificate del virus della CAA è apparso sensibile all'azione della DNasi 1 e della nucleasi S1 ma non della RNasi A, indicando quindi che il virus della CAA è costituito da una molecola di DNA monocatenaria. La dimensione del DNA, determinata in condizioni denaturanti con l'elettroforesi in agar gel, è apparsa di 2.3 kb. Una molecola bicatenaria di DNA di dimensioni simili a quelle del DNA virale è stata identificata nelle cellule MSB1 infettate con il virus della CAA. Questa molecola di DNA bicatenario è stata clonata nel plasmide di trascrizione pGEM-1. In seguito alla separazione dal plasmide ed al trattamento con ligasi il DNA clonato era in grado di transfettare le cellule MSB1. Questa

osservazione indica che la dimensione del DNA del virus della CAA è notevolmente più piccola rispetto a quella dei parvovirus. La sua posizione tassonomica non è pertanto ancora stata stabilita.

Sono state allestite sonde da molecole clonate di DNA per evidenziare il virus della CAA nei tessuti di animali infettati sperimentalmente. La disponibilità di tali sonde consente di approfondire le conoscenze circa la epidemiologia dell'infezione negli allevamenti commerciali rispetto a quelle ottenute mediante l'applicazione delle metodiche assai laboriose di isolamento del virus.

Qual'è l'importanza dell'infezione del virus della CAA? Ha certamente un ruolo determinante quando è inoculato in pulcini di un giorno privi di anticorpi. È stato pure dimostrato da altri AA che esso riveste importanza quando è associato ad altri agenti quali il virus della bursite infettiva. Noi abbiamo isolato stipiti nel corso della sindrome runting/stunting e riteniamo che esso, in questa sindrome, può avere la stessa importanza degli enterovirus. In teoria il virus della CAA non costituisce un problema in presenza di elevati titoli anticorpali e di insensibilità dei pulcini protetti passivamente. È tuttavia interessante notare come pochissimi allevamenti presentino anticorpi distribuiti in modo uniforme esistendo inoltre la possibilità che un certo numero di pulcini non presenti anticorpi passivi e possa quindi essere sensibile all'infezione.

Noi abbiamo dimostrato come concentrazioni ridotte di virus della CAA, inoculate per via intramuscolare in pulcini sensibili non inducano anemia; pertanto la determinazione della contaminazione virale mediante inoculazione di pulcini deve essere valutata sia sulla base della sieroconversione nei riguardi del virus della CAA che della comparsa di anemia e delle lesioni istopatologiche tipiche.

G. MEULEMANS and M. DECAESSTECKER

IMPORTANZA DEGLI ENTEROVIRUS NELLA SINDROME DA MALASSORBIMENTO DEL POLLO

National Institute for Veterinary Research
99 Groeselenberg 1180 Brussels - Belgium

A. INTRODUZIONE

A causa dei danni economici, i problemi enterici dei broilers, nonché quelli ad essi associati, vengono sempre più frequentemente descritti (Mc Ferran et al, 1983). In tutto il mondo è stata riportata la presenza di una sindrome chiamata da malassorbimento, «stunting o runting syndrome» (Kouwenhoven et al;, 1978 a e b, Vertommen et al., 1980; Randall et al. 1981; Page et al., 1982; Pass et al., 1982; Kouwenhoven et al., 1983; Bracewaell and Randall, 1984; Riddel and Derow, 1984). Tale sindrome è caratterizzata da una grave enterite mucoide e diminuita crescita. La presenza di polli di dimensioni inferiori che causano disomogeneità dei gruppi è subito evidente. Soltanto occasionalmente si riscontrano anomalie nel piumaggio.

La responsabilità dei disturbi enterici è stata attribuita a virus diversi, inclusi i reovirus, adenovirus, rotavirus ed enterovirus-like. Essi sono comunemente isolati dai contenuti intestinali e ciecali (Kouwenhoven et al., 1978a; Meulemans et al., 1980; Van der Heide et al., 1981; Page et al. 1982; Pass et al. 1982; Hieronymus et al., 1983; Mc Nulty et al., 1984; Meulemans et al., 1985; Decaesstecker et al, 1986; Nersessian et al., 1986; Yason and Shat, 1986; Kibenge and Dhillin, 1987; Mc Nulty et al 1987; Decaesstecker et al., 1988). Sono stati inoltre isolati calicivirus, togavirus e parvovirus. (Wyeth et al., 1981; Kisary et al., 1984; Farmer and Taylor, 1985; Kisary, 1985; Frazier et al., 1986a, b).

In questo lavoro si è voluto valutare il significato della presenza di questi virus nella sindrome la malassorbimento per mezzo di indagini epidemiologiche, riproduzione sperimentale e studi sulla patogenicità.

B. Ricerca Epidemiologica (Decaesstecker et al., 1988)

I contenuti ciecali ed intestinali di soggetti provenienti da 102 allevamenti industriali di broilers, affetti da disturbi enterici, furono esaminati per la ricerca di virus con la microscopia elettronica e per 90 di essi anche tramite l'isolamento in colture cellulari.

L'esame alla microscopia elettronica diretta (EM) fu condotto secondo il metodo C di Mc Nulty e coll. (1973). L'isolamento dei virus fu eseguito in epatociti di embrione di pollo. L'identificazione dei virus coltivati in colture di tessuto fu attuata mediante immunofluorescenza diretta (Meulemans e coll. 1978) o previa colorazione negativa del supernatante della coltura.

I 102 campioni esaminati provenivano da allevamenti di broilers con vari sintomi clinici riferibili a disturbi enterici. I volatibili vennero raggruppati in 4 diverse fasce di età: 21 di una settimana, 62 di due; 12 di tre, 7 di quattro settimane ed oltre.

La maggioranza dei disturbi enterici si verificava nei gruppi di due settimane di età. Il problema più comunemente riscontrato fu la presenza di gruppi disomogenei (68,2% dei campioni). Il 55,7% ed il 46.6% dei gruppi esaminati presentavano rispettivamente ritardo nella crescita ed enterite. Si verificarono solo pochi casi di alterazioni del piumaggio (19,3% dei gruppi), prevalentemente all'età di due settimane.

Una ricerca sulla trasmissione verticale tramite l'isolamento del virus da animali di età compresa tra una e quattro settimane (tabella 1) dimostrò che 34/46 casi di infezione da enterovirus-like furono evidenziati in pulcini appartenenti ai gruppi di una e due settimane di età, corrispondendo al 94% del totale delle infezioni da enterovirus-like. Reovirus, rotavirus ed adenovirus furono isolati dai gruppi di età compresa tra una e quattro settimane.

I virus infettanti furono evidenziati sia da soli, sia in associazione. Le infezioni singole furono riscontrate nel 60% (52/86) dei gruppi in cui il virus fu isolato (gruppi positivi). Ciò corrisponde a 16 gruppi infettati dal solo enterovirus-like, 21 da reovirus, 11 da rotavirus e 4 da adenovirus. La maggior parte delle infezioni multiple si riscontrò nella seconda settimana di vita, principalmente sostenute da enterovirus e reovirus (14 gruppi) e da reovirus e rotavirus (9 gruppi); 4 gruppi

erano infetti da reovirus ed adenovirus prevalentemente nei soggetti di 3 settimane; 2 presentavano enterovirus-like associati a rotavirus. Furono pure osservate infezioni triplici causate da enterovirus-like con reovirus e rotavirus (2 gruppi) e da reovirus con rotavirus e adenovirus (1 gruppo).

Da tali risultati appare che il periodo critico per l'insorgenza dei sintomi clinici riferibili a disturbi da malassorbimento è la seconda settimana di vita. I quattro diversi tipi di virus isolati dai contenuti intestinali e dal cieco dei soggetti provenienti dai 102 allevamenti di broilers con disturbi enterici furono, in ordine di prevalenza, reovirus, enterovirus-like, rotavirus ed adenovirus. Non vennero isolati calicivirus, togavirus e parvovirus, sebbene alcuni di essi siano stati isolati da altri AA. (Wyeth et al., 1984-1985; Frazier et al., 1986a, b).

Enterovirus-like furono isolati regolarmente nelle prime due settimane di vita, il 94% dei quali da animali di età di 1 o 2 settimane. Tale isolamento non fu realizzato in nessun animale di età superiore a 21 giorni. La loro presenza in animali molto giovani è presumibilmente imputabile ad infezioni precoci. L'ipotesi di una trasmissione verticale del virus potrebbe fornire una spiegazione plausibile della sua precocità secondo quanto proposto da Spackman et al (1984) e da Wyeth e Chettle (1985). La contaminazione con enterovirus di vaccini somministrati a pulcini alla nascita, come suggerito da Connor et al. (1987), potrebbe rappresentare un fattore importante.

Resta tuttavia difficile stabilire il significato di tali virus nell'insorgenza di sindromi cliniche riferibili a disturbi enterici, nonché di problematiche legate a malassorbimento nei giovani volatili, dal momento che virus simili possono frequentemente essere riscontrati anche in allevamenti sani (Mc Ferran et al., 1986; osservazione personale). Pertanto abbiamo programmato alcune ricerche di infezione sperimentale allo scopo di valutare l'importanza di alcuni di questi virus nella sindrome da malassorbimento.

C. Ricerche Sulla Riproduzione Sperimentale Dell'Infezione (Decaesstecker et al., 1986; Meulemans et al., 1986)

La sindrome da malassorbimento può essere sperimentalemente trasmessa con la somministrazione per *os* a pulcini di un giorno di

omogenato di tessuto intestinale, preparato da animali affetti da malassorbimento (Kouwenhoven et al., 1978a; Vertommen et al., 1980). Furono pertanto impiegate diverse preparazioni intestinali contenenti parvovirus aviare, enterovirus-like associato a reovirus provenienti da materiale di campo o enterovirus-like e reovirus da soli. Esse furono somministrate a pulcini S.P.F. White Leghorn di un giorno di età e broilers di allevamenti commerciali. Tutti i volatili erano allevati in isolatori riscaldati con pavimento grigliato protetti da filtri assoluti per il ricambio dell'aria. Venivano alimentati con una miscela commerciale per broilers al 22% di proteine.
Ai soggetti in esperimento vennero somministrate per *os* ad 1 giorno di vita 100 µl di preparazione virale. I gruppi di controllo erano costituiti da animali della stessa età ed origine non sottoposti ad alcun trattamento. Come indicato nelle tabelle, i pulcini venivano pesati ed esaminati al tavolo necroscopico a diversi intervalli di tempo.

L'incremento ponderale fu calcolato come differenza tra il peso al giorno di somministrazione e quello al giorno dell'abbattimento. La percentuale del ritardo di crescita fu determinata applicando la seguente formula:

$$\% \text{ ritardo crescita} = \frac{\textit{incr. pond. contr.} - \textit{incr. pond. inf.}}{\text{incr. pond. contr.}} \times 100$$

C.1. Infezione Sperimentale con Parvovirus

Una preparazione virale purificata del ceppo ABU (Kisary et al., 1984) venne allestita somministrando per *os* a pulcini di un giorno di vita particelle purificate in gradiente di CsC1 (d=1,42 gr/cm^3). Gli animali vennero abbattuti dopo 8 giorni ed i rispettivi tratti intestinali, dopo raccolta e miscelazione, furono sospesi in soluzione tampone TNE al 25%. Tale sospensione fu sottoposta a congelamento e scongelamento ed infine chiarificata tramite centrifugazine a 10.000 g per 30 min. a 4° C. Tale preparazione fu conservata a – 20° C.

Non si osservò alcun sintomo o ritardo nella crescita sia nei polli S.P.F. che nei broilers infettati per *os* ad un giorno di età con il ceppo ABU di parvovirus (tabella 2). In ciascun esperimento le particelle di

parvovirus vennero evidenziate tramite esame al microscopio elettronico delle feci degli animali infettati, effettuato dopo 7 giorni dall'inoculazione.

C.2. Infezione Sperimentale con Materiale di Campo

Si impiegarono due diverse preparazioni di materiale di campo. La prima (materiale di campo n. 1) fu ottenuta con un passaggio in pulcini di un giorno di una sospensione intestinale allestita da broilers che mostravano una crescita stentata. La seconda (materiale di campo n. 2) fu allestita omogeneizzando direttamente in soluzione tampone TNE l'intestino, il cieco ed il proventricolo di broilers con sintomi di malassorbimento e proventricolite.

Si dimostrò mediante esame al microscopio elettronico la presenza di numerose piccole particelle rotonde e prive di envelope di enterovirus-like (diametro medio e s.d. di 35,4 + 1,9 nm) associato a reovirus in entrambe le preparazioni provenienti dal materiale di campo.

Chiarificazione del materiale di campo n. 2

L'omogenato di materiale di campo n. 2 fu sottoposto a chiarificazione mediante centrifugazione a 10.000 g per 30 min. a 4° C. Il supernatante venne raccolto e conservato a – 20° C per ulteriori ricerche.

Pulcini S.P.F. e broilers infettati per *os* ad un giorno di età con entrambe le preparazioni di materiale di campo cominciarono a presentare feci anomale entro 3 giorni dalla somministrazione, per circa 8 giorni. Alcuni pulcini presentarono imbrattamento della cloaca all'età di 5-7 giorni. I soggetti infettati risultarono disomogenei e più piccoli rispetto ai controlli.

La crescita era ritardata in modo significativo ($P \leq 0.001$) ed era maggiore nel corso della prima settimana dalla somministrazione rispetto a quelle successive. Il ritardo di crescita riscontrato nei pulcini S.P.F. dopo 7 giorni dalla infezione con materiale di campo variava tra il 70,14% ed il 44,21 (tabella 3).

All'esame necroscopico, eseguito 7 giorni dopo l'inoculazione, vennero evidenziati anemia della parete del piccolo intestino e presenza, nel cieco e nel tratto intestinale, di materiale fluido e talvolta anche filamentoso. Alcuni animali infettati con il materiale di campo n° 2 presentavano proventricolite.

Non sono state evidenziate anomalie del pancreas o riduzione della borsa di Fabrizio o del timo. Durante il periodo di osservazione non furono rilevate variazioni del piumaggio, anomalie ossee o incremento della mortalità. Nel gruppo degli animali infettati durante la prima settimana si riscontrarono cannibalismo e tendenza a rimanere isolati. Gli animali scarsamente sviluppati erano comunque vivaci.

All'età di 7 giorni, enterovirus-like e reovirus si evidenziarono mediante osservazione al microscopio elettronico delle feci dei soggetti infettati sperimentalmente.

I pulcini S.P.F. infettati per *os* all'età di un giorno con materiale di campo n° 2 previamente chiarificato, presentarono la stessa sintomatologia clinica di quelli infettati con materiale di campo non trattato. Sebbene il ritardo della crescita di questo gruppo fosse significativo (37,6%, $P \leq 0.001$), era tuttavia inferiore rispetto a quello ottenuto in seguito alla somministrazione dello stesso materiale non chiarificato (tabella 3).

I valori del ritardo della crescita riscontrati erano fra loro maggioremente comparabili rispetto a quelli ottenuti in seguito alla inoculazione con la preparazione enterovirus-like chiarificata prima del congelamento a – 20° C (tabelle 4-5).

C. 3 Infezione Sperimentale con Enterovirus-Like

Allo scopo di purificare gli enterovirus-like, i due omogenati di campo vennero separatamente sottoposti a pellettatura tramite uno strato di saccarosio al 45% a 100.000 g per 90 min. a 4° C.

I pellets furono risospesi in tampone TNE in 1/100 del volume iniziale e filtrati attraverso membrana Millipore di 50 nm. Con i filtrati

vennero inoculati pulcini S.P.F. che furono abbattuti dopo 7 giorni; gli intestini furono raccolti e trattati come descritto.

In pulcini S.P.F. di un giorno si eseguirono tre successivi passaggi per via orale, usando gli omogenati derivati da questi due filtrati. I supernatanti delle sospensioni virali centrifugate, ottenuti dopo ciascun passaggio di 7 giorni, vennero conservati a – 20° C e così classificati: gli enterovirus-like purificati a partire dal primo materiale di campo, stocks di enterovirus-like n° 1, 2 e 3 (entero 1, 2 e 3), gli enterovirus-like provenienti dal secondo materiale di campo, stocks di enterovirus-like responsabili di proventricolite n° 1, 2 e 3 (entero PV1, PV2 e PV3).

L'esame al microscopio elettronico evidenziò numerose particelle di enterovirus-like in tutti gli stocks dei preparati.

Controlli sull'assenza di reovirus e di altri virus furono eseguiti inoculando cellule epatiche e renali di embrioni di pollo insieme a centrifugazione isopicnica in cloruro di cesio degli stocks di enterovirus-like seguita da frazionamento del gradiente ed esame di tutte le frazioni con densità compresa fra 1,31 ed 1,43 g/cm^3.

Ricorrendo a tali tecniche nessun'altra particella di enterovirus-like (ELP) (d: 1,35-1,37 g/cm3) poté essere evidenziata.

Polli S.P.F. e broilers infettati per *os* ad un giorno di età con gli enterovirus-like provenienti da entrambe le preparazioni di materiale di campo, presentarono i sintomi clinici osservati e riportati per quei materiali. In sede di esame necroscopico si osservò anche proventricolite a 7 giorni dall'inoculazione negli animali infettati sperimentalmente con gli enterovirus-like provenienti da materiale di campo n° 2.

Come riportato per i materiali di campo grezzi, il ritardo della crescita era più evidente durante la prima settimana (tabella 4).

Il ritardo della crescita dei polli S.P.F., registrato a 7 giorni dall'inoculazione con i vari virus entero-like singoli, fu altamente significativo (da $P \leq 0.01$ a $P \leq 0.001$), ma i polli non raggiunsero lo stesso grado di decremento ponderale ottenuto con i materiali di

campo. Il calo di peso registrato con i polli S.P.F. infettati con i soli enterovirus-like variava tra il 19,50% e 42,39% (tabelle 4 e 5).

Le particelle di enterovirus-like vennero osservate al microscopio elettronico nelle feci di tutti i soggetti inoculati ed abbattuti 7 giorni dopo l'infezione.

C. 4 Infezione Sperimentale con Reovirus

Lo stipite di reovirus impiegato nella prova fu isolato mediante inoculazione in epatociti di embrione di pollo con lo stock di materiale di campo.

Il virus venne identificato tramite l'impiego della microscopia elettronica e della immunofluorescenza diretta, usando un antisiero anticeppo EK 1133 di Van der Heide (Meulemans et al., 1980) coniugato con fluorsceina. Dopo 3 passaggi in queste cellule, il supernatante venne raccolto e conservato a – 20° C ed utilizzato come stock virus.

Nei polli S.P.F. infettati per via orale all'età di un giorno non si osservò alcun sintomo clinico o ritardo nella crescita (tabella 6). Reovirus venne reisolato a 7 giorni di età dalle feci degli animali inoculati.

Da questi studi d'infezione sperimentale si possono trarre differenti conclusioni.

Nei nostri esperimenti è stato possibile riprodurre, almeno in parte, la sindrome da malassorbimento in pulcini S.P.F. e broilers di un giorno somministrando per *os* omogenati grezzi allestiti da materiale di campo e contenenti enterovirus-like associati a reovirus, come pure con omogenati grezzi contenenti i singoli enterovirus-like purificati.

Al contrario il ceppo ABU del parvovirus ed il reovirus non indussero alcun sintomo clinico né crescita ritardata dopo somministrazione per via orale a pulcini di un giorno. La moltiplicazione virale avvenne a livello intestinale e si reisolarono i virus a 7 giorni dalla somministrazione. Nel siero di sangue dei pulcini di un giorno, con la

tecnica ELISA, non furono evidenziati anticorpi e pertanto l'assenza dei risultati positivi ottenuti con questo virus non possono essere riportati alla presenza di una eventuale immunità materna. Dopo l'infezione sperimentale degli animali si verificò sieroconversione. L'assenza di patogenicità registrata con il reovirus in questa sede conferma i risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio (Meulemans et al., 1980) e quelli di Mc Nulty et al. (1984).

Il ritardo della crescita registrato dopo somministrazione per via orale dei materiali di campo o dei singoli enterovirus-like, fu altamente significativo. La capacità di ridurre l'incremento ponderale fu conservata attraverso passaggi nei polli delle preparazioni purificate di enterovirus-like. Questa rilevazione avvalora l'ipotesi dell'eziologia virale. Il reovirus nel materiale di campo non ne è apparentemente la causa, a motivo della mancanza di patogenicità quando inoculato da solo. Ciò suggerisce un ruolo dell'enterovirus-like nell'eziologia della sindrome da malassorbimento e conferma le osservazioni di Mc Nulty et al. (1984), che sostenevano come la distruzione delle cellule intestinali nel piccolo intestino da parte dell'enterovirus-like causi una forma di diarrea da malassorbimento che esita in a un ridotto incremento ponderale.

Noi osservammo che il ritardo medio della crescita indotto da enterovirus-like da soli risultava inferiore rispetto a quello ottenuto con i materiali di campo da cui derivavano. Si confermò inoltre che la semplice centrifugazione a 10.000 g del materiale di campo era causa di una riduzione della patogenicità come pure di una diminuzione del ritardo della crescita rispetto a quanto osservato in seguito alla inoculazione con enterovirus-like purificato. Infatti, la semplice chiarificazione degli stoks di enterovirus-like poteva essere responsabile del minor ritardo di crescita registrato tra il materiale di campo e le prove fatte con enterovirus-like. Si può supporre che alcune particelle virali siano assorbite a frammenti cellulari e vengano in tal modo perdute nel corso della chiarificazione.

La conseguente diminuzione del titolo virale indotta dalla chiarificazione potrebbe essere responsabile del minor ritardo di crescita. Questi risultati potrebbero significare d'altra parte che particelle a

elevata sedimentazione, come i batteri e i lieviti, siano associate agli enterovirus-like nell'eziologia della sindrome da malassorbimento. La responsabilità di batteri come agenti patogeni infettanti nella sindrome del malassorbimento è stata suggerita anche da Kouwenhoven et al (1983).

Noi abbiamo osservato che il decremento ponderale era meno rilevante durante la seconda e la terza settimana dopo l'infezione che nella prima, suggerendo pertanto un effetto temporaneo. Per questa ragione il tempo di osservazione per alcuni dei nostri esperimenti è stato limitato ad una sola settimana dopo l'infezione.

Oltre al decremento ponderale, gli animali infettati con materiale di campo o con enterovirus-like presentavano alcune delle manifestazioni descritte nella sindrome da malassorbimento. Tre giorni dopo l'infezione si manifestava una diarrea giallastra seguita in molti animali da imbrattamento dell'orifizio anale. Durante la prima settimana si potevano inoltre osservare alcune caratteristiche comportamentali insolite come cannibalismo e tendenza all'isolamento. All'esame necroscopico si evidenziavano le tipiche lesioni consistenti in anemia della parete intestinale e contenuto acquoso dell'intestino e del cieco. L'esame post mortem, effettuato al 7° giorno dall'infezione, in pulcini infettati con materiale di campo o con enterovirus-like ottenuto da quel materiale, metteva in evidenza la presenza di proventricolite. Queste lesioni erano già state descritte da Kouwenhoven et al. (1978b) in broilers affetti da sindrome da malassorbimento.

Dopo l'infezione non si misero in evidenza alterazioni delle piume od ossee, ma, d'altra parte, questi sintomi erano rari anche nel corso della malattia naturale, verificatasi in Belgio. Tali sintomi non si manifestavano generalmente fino alla seconda, terza settimana di vita (Bracewell e Randall, 1984), per cui la durata inferiore di alcuni nostri esperimenti, non ne consentì la manifestazione.

Come conclusione di questa parte di lavoro, potremmo affermare che le particelle enterovirus-like assumono un ruolo determinante nell'eziologia delle enteriti e della sindrome da malassorbimento dei pulcini.

In molti Paesi sono stati isolati diversi enterovirus, tra cui il virus

della nefrite aviare (Yamaguchi et al., 1979), particelle entero-like (ELP), descritte da Mc Nulty et al. (1984) in Irlanda e particelle ELP isolate in Belgio (Decaesstecker et al., 1986; Meulemans et al., 1986). Con l'impiego della reazione di immunofluorescenza e della sieroneutralizzazione fummo in grado di dimostrare una reazione antigenica crociata tra il sierotipo G 4260 del virus della nefrite aviare e le particelle entero-like isolate in Irlanda ed in Belgio. Non furono evidenziate reazioni crociate tra questi virus ed il virus dell'encefalomielite aviare (tabelle 7 e 8) (Decaesstecker e Meulemans, in corso di stampa).

Nelle ulteriori prove riportate, abbiamo messo a confronto la patogenicità di questi diversi virus.

D. Ricerche Sperimentali sulla Patogenicità di differenti Enterovirus Aviari (Decaesstecker et al., in corso di stampa)

Tutti i pulcini utilizzati derivavano da uova S.P.F. (Valo Lohman) ed erano allevati, fin dal momento della schiusa, in isolatori con pavimentazione grigliata.

L'infezione sperimentale avveniva somministrando, per via orale, 100 µl di preparazione virale. I differenti gruppi di animali erano mantenuti in isolatori separati.

Per l'infezione sperimentale vennero impiegati due enterovirus-like (entero PV2 ed entero 3) isolati nel nostro laboratorio (Decaesstecker et al., 1986, Meulemans et al., 1986), il sierotipo giapponese ANV di Yamaguchi et al. (1979) ed il sierotipo ELP-1 descritto da Mc Nulty et al. (1984). I sierotipi ANV e ELP-1 furono forniti dal Dr. Mc Ferran, Veterinary Research Laboratories, Stormont, Belfast, BT 43 SD, Northern Ireland.

Il sierotipo ANV è stato coltivato mediante passaggi seriali in cellule di rene di pulcino (CKC), come descritto da Decaesstecker e Meulemans (pubblicazione in corso di stampa). Il titolo finale, valutato come dose infettante 50 (TCID 50) secondo la regola di Reed e Muench (1938) era di 2.13 x $10.^{8}$ TCID 50/ml.

I sierotipi ELP-1, l'enterovirus PV2 e 3 erano allestiti da omogenati intestinali e ciecali, al 20% w/v in tampone TNE (tris 0.01 M, NaC1

0.1 M, EDTA 0.001 M pH 8.7) di pulcini S.P.F. di quattro giorni, inoculati ad un giorno di vita, rispettivamente con ognuno di questi virus. Come descritto da Decaesstecker et al. (1986), gli enterovirus PV2 e 3 erano esenti da altri agenti enteropatogeni contaminanti. Il ceppo ELP-1 era invece contaminato da particelle di reovirus (Mc Nulty et al., 1984).

In una prima ricerca tre gruppi di pulcini S.P.F. erano rispettivamente inoculati all'età di 1, 3, 7 giorni con il ceppo ELP-1.

Da uno ai quattro pulcini venivano sacrificati quotidianamente nei primi 7-8 giorni dall'inoculazione (PI). Si prelevavano tre parti del tessuto intestinale. La prima era la parte mediana del tratto ascendente del duodeno (zona 1), la seconda era situata a 7-10 cm. in prossimità del residuo del sacco vitellino (area 2) e la terza era la porzione terminale dell'ileo (area 3). I due pulcini S.P.F. di controllo, sacrificati a 5 giorni di vita, venivano sottoposti allo stesso trattamento. Da ogni campione intestinale venivano allestite sezioni al criostato (5 nm.) che erano esaminate per la presenza di antigene virale mediante la reazione di immunofluorescenza diretta.

Il primo esperimento venne eseguito allo scopo di determinare il periodo e la zona di massima replicazione dello stipite ELP nell'intestino e l'importanza dell'età al momento dell'inoculazione. Reazioni di immunofluorescenza positive si osservarono nel citoplasma delle cellule epiteliali di tutte le tre zone intestinali esaminate già dopo un giorno dall'inoculazione. Un maggior numero di cellule positive fu osservato nella zona 2 seguita dalla 1 e dalla 3. Al primo giorno dopo l'infezione, le cellule infette erano concentrate soprattutto alla base dei villi intestinali, mentre successivamente le stesse erano diffuse a tutta la superficie dei villi.

Inoltre, i pulcini di un giorno erano più sensibili di quelli di maggiore età. Come riportato nella tabella 9, il numero di cellule positive e la replicazione virale nel tempo erano in rapporto al periodo di vita in cui si eseguiva l'infezione. L'antigene virale ELP era infatti presente in numerosi elementi cellulari nei successivi 8 giorni dall'infezione quando la stessa era eseguita al 1° giorno di vita. La sua presenza era ridotta a 5 e a 4 giorni quando l'infezione era eseguita rispettivamente al 3° ed al 7° giorno di vita. Erano comunque riscontrabili, fra gli animali, variazioni individuali.

I controlli non presentavano positività alla reazione di immunofluorescenza diretta.

In una seconda ricerca, i pulcini di un giorno suddivisi in quattro gruppi (tabella 10) erano infettati per via orale rispettivamente con gli stipiti ELP-1, enterovirus PV2, enterovirus 3 o ANV. L'ultimo gruppo era utilizzato come controllo e quindi non sottoposto ad alcun trattamento.

Quattro-cinque animali di ogni gruppo vennero sacrificati al 3°, 7° e 14° giorno dall'infezione. Dalla zona 2 dell'intestino furono raccolti, immediatamente dopo la morte, tre campioni:

– il primo fu direttamente esaminato alla reazione di immunofluorescenza;

– il secondo venne lavato in PBS e fissato in tampone;

– il terzo fu lavato in PBS e fissato in tampone«cacodilato-gluteraldeide» per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a quello a trasmissione (TEM). L'esame al microscopio elettronico a trasmissione fu eseguito solo sui pulcini di 4 giorni.

Gli intestini ciechi vennero raccolti e congelati a – 20° C per evidenziare particelle virali mediante l'osservazione al TEM.

I reni, il proventricolo ed il pancreas vennero raccolti soltanto da soggetti di 15 giorni ed immediatamente fissati per l'esame istologico.

La moltiplicazione dei diversi virus nell'area 2 dell'intestino fu dimostrata tramite la reazione di immunofluorescenza. La fluorescenza venne osservata nel citoplasma degli enterociti a 3 e a 7 giorni dall'inoculazione con ELP-1, enterovirus PV2 o 3. Si osservarono poche cellule con debole fluorescenza in alcuni soggetti 14 giorni dopo l'inoculazione.

Alcuni animali (3/5) erano positivi al 3° giorno con lo stipite ANV e soltanto un soggetto fu positivo al 7° giorno dall'inoculazione. Inoltre la quantità di cellule positive risultò inferiore a quella dei soggetti inoculati con diversi tipi di ELP (tabella 10).

Non fu evidenziata alcuna immunofluorescenza nelle sezioni intestinali dei controlli non inoculati.

La replicazione del virus a livello intestinale fu dimostrata anche attraverso l'osservazione di particelle virali nel contenuto ciecale dei polli a 3 e a 7 giorni dall'inoculazione con virus ELP-1, enterovirus

PV2 e 3. L'eliminazione del virus continuò, con enterovirus PV2, sino a 14 giorni dal trattamento.

Non si rilevò alcuna particella virale nelle preparazioni ciecali dal gruppo inoculato con ANV e da quello di controllo.

Mediante l'osservazione con TEM di sezioni ultrasottili dei villi si riscontrarono vacuoli contenenti strutture cristalline di particelle virali localizzate nel citoplasma degli enterociti a 3 giorni dall'infezione per ciascuno dei quattro virus inoculati. Tuttavia essi apparvero più numerosi per l'enterovirus PV2 e relativamente scarsi, sebbene presenti, nel caso di ANV.

Le cellule infette erano prevalentemente riscontrate alla base dei villi. La presenza di strutture cristalline del virus venne generalmente associata a degenerazione vacuolare degli enterociti e ad accorciamento dei microvilli. Tali lesioni portarono, in certe aree, alla totale desquamazione delle cellule epiteliali.

Nonostante il limitato riscontro di cristalli di virus ANV, gli enterociti dei polli appartenenti a questo gruppo risultarono talvolta molto vacuolati.

Per mezzo dell'osservazione al SEM si evidenziarono modifiche dei villi intestinali principalmente a 3 e a 7 giorni dall'infezione con virus ELP-1, enterovirus PV2 e 3. La diminuzione dei rapporti villo/cripta, se paragonata ai soggetti non inoculati, apparve significativa (tabella 10). Tale effetto era assai pronunciato a 7 giorni dall'infezione per poi scomparire a 14 giorni. Da 3 giorni dall'infezione, con un picco al 7° giorno, furono osservate delle lesioni degli enterociti che variavano da accorciamento dell'orlo dei microvilli ad una totale desquamazione dell'epitelio intestinale. 14 giorni dopo l'infezione, l'aspetto generale dei villi intestinali era quasi normale.

Si osservò rigonfiamento degli enterociti apicali dei villi prevalentemente a 7 giorni dall'infezione. Al microscopio ottico furono osservate le stesse lesioni sopra descritte ed evidenziate al SEM.

A 3 e a 7 giorni dall'infezione si riscontrò degenerazione vacuolare degli enterociti situati all'apice dei villi. Inoltre la lamina propria si presentava infiltrata da cellule mononucleate. Tale invasione persistette sino a 14 giorni all'avvenuta infezione.

Nel gruppo dei soggetti inoculati con ANV si riscontrò soltanto scarso aumento della profondità delle cripte. Tramite esame al SEM si evidenziò un rigonfiamento degli enterociti apicali a 3 giorni, ma soprattutto a 7 giorni, dall'inoculazione. Tuttavia ciò non si accompagnò mai a degenerazione cellulare. Istologicamente non fu evidenziata alcuna lesione intestinale.

Le alterazioni istopatologiche del pancreas, proventricolo e reni sono riassunte nella tabella 11.

A 14 giorni dall'infezione con virus ELP-1 e con ANV si osservò desquamazione localizzata delle cellule ghiandolari epiteliali del proventricolo. L'infezione da enterovirus PV2 venne associata a necrosi ghiandolare e la stessa lesione fu anche osservata in un soggetto inoculato con enterovirus 3. In alcuni casi tali modifiche vennero associate all'accumulo di materiale necrotico nel lume delle ghiandole e alla infiltrazione del tessuto circostante da parte delle cellule mononucleate. Si registrò, inoltre, aumento ed iperplasia dei follicoli linfoidi della lamina propria.

Nei soggetti infettati con enterovirus PV2 si osservarono alcune aree di degenerazione degli acini sino alla completa scomparsa dei granuli di zimogeno nelle ghiandole esocrine del pancreas. Le isole di Langerhans non presentarono alcuna lesione. Nei polli infettati con enterovirus 3 fu evidenziata nefrite interstiziale di intensità da lieve a moderata, mentre in un soggetto infettato con ANV fu osservata una tubulonefrite associata a nefrite interstiziale. In due soggetti dell'ultimo gruppo si osservarono, inoltre, alcuni follicoli linfoidi. Queste lesioni non furono rilevate negli animali di controllo non infettati.

Sebbene ogni virus impiegato in questo esperimento appartenesse allo stesso sierotipo, tuttavia essi apparvero caratterizzati da un diverso tropismo.

I virus ELP-1, enterovirus PV2 e 3 si dimostrarono in grado di replicare attivamente negli enterociti ed indurre lesioni intestinali dopo somministrazione a pulcini S.P.F. di 1 giorno. Tuttavia non venne osservata alcuna alterazione significativa dell'intestino dopo infezione con ANV, per quanto, come dimostrato dall'esame al TEM

e alla reazione di immunofluorescenza, si verificasse in alcuni enterociti un certo grado di replicazione virale. Questa replicazione risultò però inferiore se paragonata a quella causata dagli altri virus.

Tra i virus ELP-1, enterovirus PV2 e 3 si registrarono alcune differenze nella localizzazione, gravità e durata delle lesioni intestinali (diminuzione del rapporto villo/cripta, allungamento delle cripte, accorciamento dei villi, rigonfiamento cellulare e degenerazione). L'enterovirus PV2, che causò le lesioni più gravi e di maggior durata, veniva anche eliminato nel corso dell'intero periodo di osservazione, in contrasto con gli altri virus esaminati.

Tutti gli enterovirus studiati causarono lesioni proventricolari, necrosi ghiandolare e infiltrazione di cellule linfoidi particolarmente rilevanti nei polli infettati con enterovirus PV2. Tale virus provocò inoltre degenerazione pancreatica.

I disturbi enterici seguiti da ritardo della crescita costituiscono l'aspetto comune nella sindrome da malassorbimento (Mc Ferran et al., 1983); particelle di enterovirus-like quali ELP-1 (Mc Nulty et al., 1984), enterovirus PV2 e 3 (Decaesstecker et al., 1986; Meulemans et al., 1986) sono già state associate a questa patologia.

Nella sindrome da malassorbimento in situazioni di campo, sono state anche riferite lesioni pancreatiche e proventricolari. Degenerazione pancreatica e fibrosi (Randall et al., 1981; Reece et al., 1984; Riddel e Derow, 1984; Sinclair et al., 1984; Martland e Farmer, 1986) nonché ipertrofia dell'epitelio ghiandolare del proventricolo con infiltrazione di cellule linfoidi (Kouwenhoven et al., 1978b; Page et al., 1982) sono state riportate come aspetti caratteristici della sindrome da «malassorbimento / stunting».

L'enterovirus PV2 responsabile del ritardo della crescita (Decaesstecker et al., 1986; Meulemans et al., 1986) causa anche lesioni intestinali, proventricolari e pancreatiche ed è perciò un probabile responsabile della sindrome da malassorbimento, come del resto già suggerito (Decaesstecker et al., 1986; Meulemans et al., 1986). Tuttavia, le lesioni pancreatiche osservate in seguito alla infezione sperimentale con questo virus erano meno gravi di quelle descritte negli episodi di campo. Non fu evidenziata l'estesa degenerazione,

atrofia e fibroplasia osservata nel tessuto esocrino del pancreas (Randall et al., 1981).

Ciò potrebbe essere attribuibile all'età precoce a cui venivano abbattuti gli animali infettati sperimentalmente. Invece, le prime alterazioni osservate nei casi di campo riguardavano esclusivamente la scomparsa dei granuli di zimogeno (Randall et al., 1981).

In questa ricerca, l'enterovirus 3 causò lesioni di nefrite intestiziale che sono specifiche dello stipite ANV (Maeda et al., 1979). Le manifestazioni cliniche dell'ANV sono piuttosto diverse (Maeda et al., 1979) da quelle degli altri enterovirus e, in contrasto con questi ultimi, non fu osservato alcun significativo ritardo di crescita dopo l'infezione sperimentale con il virus ANV (Mc Ferran e Mc Nulty, 1986; osservazioni personali).

Indagini sierologiche nei riguardi del virus ANV condotte in Giappone (Imada et al., 1980), nell'Irlanda del Nord (Connor et al., 1987) ed in Belgio (risultati non ancora pubblicati) hanno dimostrato l' alta positività sierologica nei confronti di questo virus in allevamenti di broilers ed in qualche allevamento S.P.F. Tuttavia, dal momento che il virus ANV risulta antigenicamente identico agli altri enterovirus aviari (Decaesstecker e Meulemans, in corso di pubblicazione) gli studi riportati possono riflettere, oltre alla presenza del virus ANV, anche quella di altri enterovirus correlati.

Pertanto, l'interpretazione di tali ricerche sierologiche risulta difficoltosa in quanto esse indicano la presenza di un qualsiasi enterovirus aviare con diverso tropismo che potrebbe essere coinvolto in differenti manifestazioni cliniche quali nefrite interstiziale o sindrome da malassorbimento.

E. Conclusioni Generali

– La sindrome da malassorbimento nonché la maggioranza dei disturbi enterici si verifica negli allevamenti intorno alla seconda settimana di vita.

– Le particelle di enterovirus-like sono regolarmente isolate da tutti i soggetti infettati nelle prime due settimane di vita.

– In seguito a somministrazione per os in pulcini di 1 giorno di parvovirus e reovirus non si è evidenziato alcun sintomo clinico né ritardo di crescita.

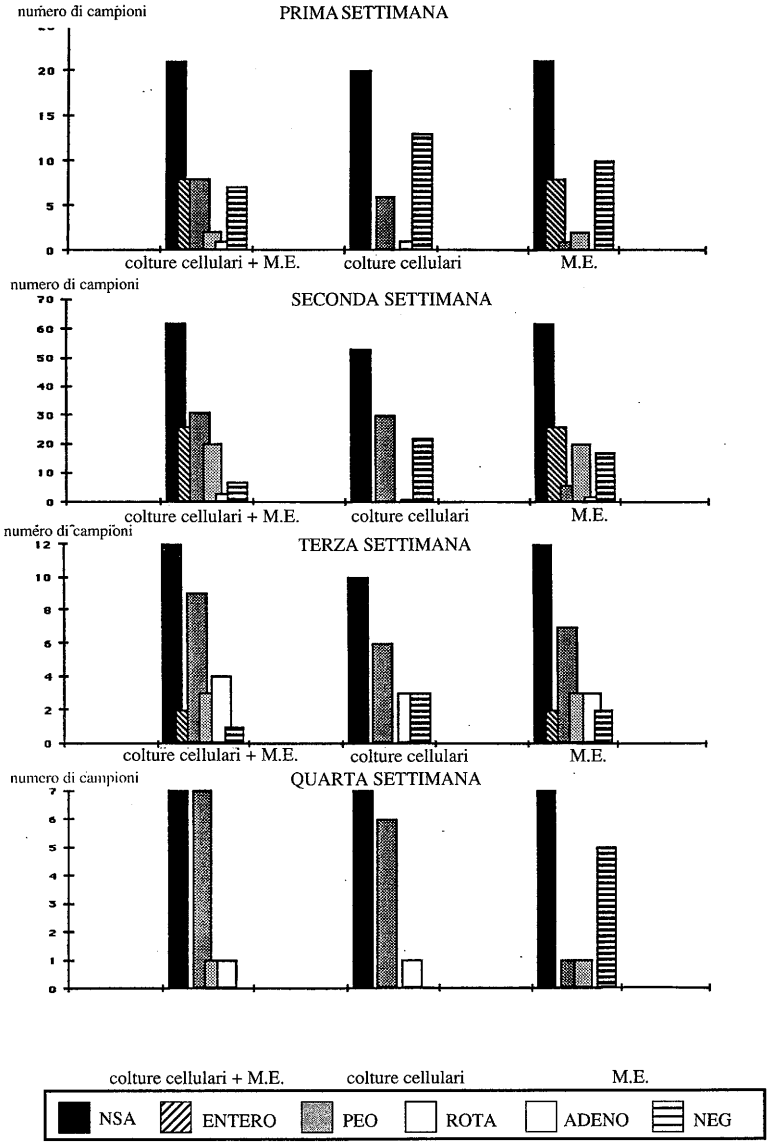
– Le particelle di enterovirus-like da sole inducono un ritardo di crescita statisticamente significativo in seguito a somministrazione per via orale a pulcini di 1 giorno.

– le particelle di enterovirus-like ed il virus della nefrite aviare sono antigenicamente simili e appartengono alla stessa specie o sierotipo.

– I membri di uno stesso sierotipo di enterovirus aviari possono presentare un diverso tropismo ed indurre sintomi clinici e alterazioni patologiche differenti.

– Qualche enterovirus-like potrebbe essere responsabile della sindrome da malassorbimento.

Tab. 1 - Ricerca sulla presenza del virus in funzione della modalità di isolamento e sull'applicazione contemporanea di vari metodi.



NSA = Numero di campioni analizzati, ENTERO entero-like virus
REO = reovirus, ROTA = rotavirus, ADENO = adenovirus, NEG = negativo
M.E. = microscopia elettronica.

Tab. 2 - Pesi ponderali e ritardo nella crescita dopo somministrazione per via orale di parvovirus a pulcini di 1 giorno di vita.

Gruppo Sperimentale	Pulcini impiegati	Pesi ponderali		
		1-8 giorni	8-15 giorni	15-21 giorni
Parvovirus[a]	75 broilers medio (g)	127.95	230.8	267
	G.R.[b] (%)	0 NS	0 NS	0 NS
Controlli	75 broilers medio (g)	128.10	221.5	262
Parvovirus[d]	75 broilers medio (g)	92.14[c]	–	–
	G.R. (%)	0 NS		
Controlli	75 broilers medio (g)	87.99	–	–
Parvovirus[d]	15 SPF medio (g)	37.60[c]	–	–
	G.R. (%)	0 NS		
Controlli	14 SPF medio (g)	33.98[c]	–	–

[a] Dal valore in gradiente in CsC1 : d = 1.43 g/cm^3
[b] Ritardo della crescita: grado di significatività delle differenze fra gli incrementi ponderali dei pulcini in esame e quelli di controllo: NS = non significativo.
[c] incremento ponderale tra il 1° ed il 7° giorno
[d] Da preparazioni del contenuto intestinale.

Tab. 3 - Incrementi ponderali e ritardi nella crescita dopo somministrazione per via orale di omogenati di materiale patologico a pulcini di 1 giorno di vita.

Gruppo Sperimentale	Pulcini impiegati	Incrementi ponderali		
		1-7 giorni	7-14 giorni	14-21 giorni
Materiale patologico No. 1	100 broilers media (g)	81.88	179.2	280
	GR.[a] (%)	24.89***	9.81***	4.44 NS
Controlli	100 broilers media (g)	109.02	198.7	293
Materiale patologico No. 1	20 SPF media (g)	18.96	50.7	–
	GR. (%)	50.38***	17.56***	–
Controlli	21 SPF media (g)	38.21	61.5	
Materiale patologico No. 2	34 SPF media (g)	10.55	–	–
	GR. (%)	70.14***	–	–
Materiale patologico No. 2	38 SPF media (g)	15.53	–	–
	GR. (%)	56.04***	–	–
Materiale patologico No. 2	20 SPF media (g)	19.71	–	–
	GR. (%)	44.21***	–	–
Materiale patologico No. 2 dopo chiarificazione	38 SPF media (g)	22.13	–	–
	GR. (%)	37.36***	–	–
Controlli	273 SPF media (g)	35.33		
	GR. (%)			

[a] Ritardo nella crescita: grado di significatività delle differenze tra gli incrementi ponderali dei pulcini in esame e quelli di controllo:
NS = non significativo, *** significatività molto elevata; P≤0.001.

Tab. 4 - Incrementi ponderali e ritardi nella crescita dopo somministrazione per via orale di omogenati di enterovirus-like purificati dal materiale patologico N° 1 a pulcini di 1 giorno di vita.

Gruppo Sperimentale	Pulcini impiegati	Incrementi ponderali		
		1-7 giorni	7-14 giorni	14-21 giorni
Entero 2	100 broilers media (g)	84.07	188.1	278
	G.R.[a] (%)	22.17**	5.33 NS	4.79**
Controlli	100 broilers media (g)	108.02	198.7	292
Entero 2	17 SPF media (g)	19.89	–	–
	G.R. (%)	42.39***		
Controlli	18 SPF media (g)	34.53	–	–
Entero 3	20 SPF media (g)	25.62	–	–
	G.R. (%)	31.16***		
Controlli	19 SPF media (g)	37.22	–	–

[a] Ritardo di crescita: grado di significatività delle differenze fra gli incrementi ponderali dei pulcini in esame e quelli di controllo:
NS = non significativo ** significatività elevata: P≤ 0.01.*** significatività molto elevata : P≤ 0.001.

Tab. 5 - Incrementi ponderali e ritardo nella crescita dopo somministrazione per via orale di omogenati di enterovirus-like purificati dal materiale patologico N° 2 a pulcini di 1 giorno.

Gruppo Sperimentale	Pulcini impiegati	Incrementi ponderali 1-7 giorni
Entero PV2	28 SPF media (g)	22.32
	G.R.[a] (%)	28.69**
Controlli	28 SPF media (g)	31.30
Entero PV3	22 SPF media (g)	29.10
	G.R. (%)	19.50***
Controlli	22 SPF media (g)	36.15
Entero PV3	17 SPF media (g)	20.82
	G.R. (%)	41.07***
Entero PV3	18 SPF media (g)	24.75
	G.R. (%)	29.94***
Controlli	273 SPF media (g)	35.33

[a] Ritardo nella crescita: grado di significatività delle differenze fra gli incrementi ponderali dei pulcini in esame e quelli di controllo: ** significatività elevata: P≤0.01. *** significatività molto elevata: P≤0.001.

Tab. 6 - Incrementi ponderali e ritardo nella crescita dopo somministrazione per via orale con reovirus a pulcini di 1 giorno di vita.

Gruppi sperimentali	Pulcini impiegati	Incrementi ponderali 1-7 giorni
Reovirus	18 SPF media (g)	40.84
	G.R.[a] (%)	0 NS
Controlli	16 SPF media (g)	36.29

[a] Ritardo nella crescita: grado di significatività delle differenze tra gli incrementi ponderati dei pulcini in esame e quelli di controllo: NS = non significativo.

Tab. 7 - Studio delle correlazioni antigeniche di diversi ceppi di enterovirus mediante reazioni crociate di immunofluorescenza.

Antisieri	Antigeni					
	ANV	Mc Nulty's ELP's	Entero PV2	Entero 3	AEV	Reovirus EK 1133
ANV	+	+	+	+	–	–
Mc Nulty's ELP's	+	+	+	+	–	+
Entero PV2	+	+	+	+	–	–
Entero 3	+	+	+	+	–	–
AEV	–	–	–	–	+	–
Reovirus EK 1133	–	+	–	–	–	+

ANV = Virus della nefrite aviare, ELP's = particelle entero-like, AEV = virus dell'encefalomielite aviare.

Tab. 8 - Studio delle correlazioni antigeniche di enterovirus ed entero-like virus mediante neutralizzazione crociata.

	Sieri	dose neutralizzante 50% (titolo)
ELP's:	Mc Nulty's ELP's	1:2085
	Entero 3	1:929
	Entero PV2	1:359
ANV		1:358
AEV		<1:2

ANV = virus della nefute aviare
ELP'S = particelle entero-like
AEV = virus dell'encefalomelite aviare

Tab. 9 - Evidenziazione mediante la reazione di immunofluorescenza diretta della replicazione di un virus entero-like (Mc Nulty et al., 1984) in tre diverse zone intestinali dopo somministrazione sperimentale per via orale di di pulcini di uno, tre o sette giorni di vita.

	Zona intestinale	Giorni dopo la somministrazione							
		1 giorno	2 giorni	3 giorni	4 giorni	5 giorni	6 giorni	7 giorni	8 giorni
Pulcini di 1 giorno (18)*	1 2 3	+ NE** +	+ NE +++ +++ + +	++ ++ +++ +++ + +	+ +++ + ++ + +++ + NE + + + (+)	++ +++ ++ + ++ +++ ++ (+) + + (+) (+)	++ ++ +++ + + (+)	++ ++ +++ + + (+)	++ +++ –
Pulcini di 3 giorni (14)	1 2 3	++ + +++ ++ +++ +	(+) (+) – + (+) (+)	+ + ++ +++ (+) +	+ ++ ++ +++ + NE	++ + +++ +++ + +	(+) (+) – (+) – –	– + + ++ – (+)	
Pulcini di 7 giorni (13)	1 2 3	– (+) –	++ +++ ++ +++ + ++	+ + ++ + – –	+ ++ + ++ + (+)	– – (+) – – –	– – (+) – – –	– – – – – –	
Pulcini di controllo (2)	1 2 3				– – – – – –				

* = numero di pulcini esaminati in questo gruppo; **: NE = non eseguito
– = assenza di fluorescenza
(+) = poche cellule fluorescenti
\+ = alcune cellule fluorescenti
++ = molte cellule fluorescenti
+++ = reazione fluorescente molto diffusa

Tab. 10 - Reperti istopatologici, all'immunofluorescenza ed ultrastrutturali nell'intestino di pulcini SPF di un giorno di vita sottoposti alla somministrazione sperimentale con vari enterovirus aviari.

	3 giorni PI					7 giorni PI					14 giorni PI				
	Controlli (4)a	ELP-1 (4)	Entero 3 (4)	Entero PV2 (4)	AN (4)	Controlli (4)a	ELP-1 (4)	Entero 3 (4)	Entero PV2 (4)	AN (4)	Controlli (4)a	ELP-1 (4)	Entero 3 (4)	Entero PV2 (4)	AN (4)
Istologia: intestino															
rapporto villo/cripta	4-5c	2	1-3	1-3	3-4	5-6	2-4	2-4	1-3	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
lunghezze delle cripte	-(4)b	+(4)	+(3)	+(3)	-(4)	-(4)	++(4)	+(1)	+(1)	-(4)	-(4)	-(5)	-(5)	-(4)	-(5)
degenerazione degli enterociti	-(4)	+(4)	+(1)	+(2)	-(4)	-(4)	+(1)	+(2)	-(4)	-(4)	-(4)	-(5)	-(5)	-(4)	-(5)
maggior numero di cellule mononucleate nella lamina propria	-(4)	+(2)	+(3)	+(3)	-(4)	-(4)	+(3)	+(4)	+(4)	-(4)	-(4)	+(2)	+(5)	+(4)	-(5)
SEM: intestino															
rapporto villo/cripta	3-5	1-3	1-4	2-4	3-6	5-6	1-5	1-5	0.5-5	3-6	3-8	4-8	8-10	6	8-10
lunghezza delle cripte	-(4)	+(3)	+(4)	+(2)	-(4)	-(4)	+(4)	+(4)	+(4)	±(2)	-(4)	-(5)	-(5)	±(3)	-(5)
accorciamento dei villi	-(4)	+(3)	++(3)	+(2)	-(4)	-(4)	+(4)	+(3)	+(3)	-(4)	-(4)	-(5)	-(5)	+(1)	-(5)
dilatazione delle cripte	-(4)	-(4)	-(4)	-(4)	-(4)	-(4)	+(2)	+(1)	+(2)	-(4)	-(4)	±(2)	-(5)	+(4)	-(5)
rigonfiamento cellulare	-(4)	+(2)	+(1)	+(2)	+(1)	-(4)	+(4)	+(4)	+(4)	+(2)	-(4)	±(2)	±(2)	-(4)	-(5)
degenerazione degli enterociti	-(4)	+(3)	+(1)	+(2)	-(4)	-(4)	++(4)	+(3)	+(3)	-(4)	-(4)	±(5)	±(5)	+(4)	-(5)
Immunofluorescenza: intestino															
negativo –	-(4)				-(2)e	-(4)	-(1)			-(3)	-(4)	-(2)	-(3)	-(3)	-(5)
poche cellule +				+(1)d	+(2)		+(2)	+(1)	+(3)	+(1)		+(1)	+(2)	+(1)	
alcune cellule ++		++(2)		++(1)	++(2)		++(1)	++(2)	++(1)			++(2)			
molte cellule +++		+++(2)	+++(3)	+++(1)					+++(1)						
TEM															
Presenza di virus nel cieco	–	+	+	+	–	–	+	+	+	–					
Presenza di virus nelle sezioni del piccolo intestino	–	+	+	+	–										

a: numero di pulcini esaminati; b: numero di pulcini con lesioni; c: limiti inferiori e superiori riscontrati; d: in questa prova sono stati esaminati 3 pulcini; e: in questa prova sono stati esaminati 6 pulcini. Per l'esame microscopico e SEM: – = assenza di lesione; ± lesione lieve; + presenza di lesione; ++ = lesioni rilevanti.

Tab. 11 - Alterazioni isto-patologiche del pancreas, proventricolo e rene osservate nei giorni successivi alla somministrazione sperimentale per via orale a pulcini SPF di 1 giorno di vita di vari enterovirus aviari.

	14 giorni dalla inoculazione				
	Controlli (4)*	ELP-1 (5)	Entero 3 (5)	PV2 (4)	ANV (5)
Pancreas:					
Zone di degenerazione	0**	0	0	3	0
Follicoli linfoidi	1	0	1	2	1
Proventricolo:					
Necrosi ghiandolare	0	0	1	3	0
Desquamazione epiteliale	0	4	1	0	2
Detriti cellulari nel lume	0	3	1	0	1
Reazione linfocitica con detriti cellulari nel lume	0	1	0	0	1
Follicoli linfoidi	0	1	1	2	1
Rene:					
Nefrite interstiziale	0	0	3	0	1
Tubulonefrosi	0	0	0	0	1
Follicoli linfoidi	0	0	0	0	2

* = Numero di pulcini esaminati
** = Numero di pulcini con questa lesione

BIBLIOGRAFIA

1) BRACEWELL, C.D. AND RANDALL, C.J. (1984). The infectious stunting syndrome. World's Poultry Science Journal, 40: 31-37.
2) CONNOR, T.J., MC NEILLY, F. MC FERRAN, J.B. AND MC NULTY, M.S. (1987). A survey of avian sera from Northern Ireland for antibody to avian nephritis virus. Avian Pathology, 16: 15-20.
3) DECAESSTECKER, M. CHARLIER, G. AND MEULEMANS, G. (1986). Significance of parvoviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. Avian Pathology, 15: 769-782.
4) DECAESSTECKER, M., CHARLIER, G. AND MEULEMANS, G. (1988). Epidemiologic study of enteric viruses in broiler chickens: comparison of tissue culture and direct electron microscopy. Avian Pathology, 17: 477-486.
5) DECAESSTECKER, M. AND MEULEMANS, G. (in press.). Antigenic relationships between fowl enteroviruses.
6) DECAESSTECKER, M., CHARLIER, G., PEETERS, J. AND MEULEMANS, G. (in press). Pathogenicity of fowl enteroviruses.
7) FARMER, A.M.T. AND TAYLOR, J. (1985). Infectious stunting syndrome: the isolation of a novel virus. Veterinary Record, 116: 111.
8) FRAZIER, J.A. FARMER, H. AND MARTLAND, M.F. (1986a). Enteric virus-like particles associated with a stunting syndrome of chickens. Veterinary Record, 118: 303-304.
9) FRAZIER, J.A., FARMER, H. AND MARTLAND M.F. (1986b). A togavirus-like agent in the pancreatic duct of chickens with infectious stunting syndrome. Veterinary Record, 119: 208-209.
10) HIERONYMUS, D.R.K., VILLEGAS, P. AND KLEVEN, S.H. (1983). Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. Avian Diaseases, 27: 246-254.
11) IMADA, T., YAMAGUCHI, S., MIURA, N. AND KAWAMURA, H. (1980). Antibody survey against avian nephritis virus among chickens in Japan. National Institute of Animal Health Quaterly, 20: 79-80.
12) KIBENGE, F.S.B. AND DHILLON, A.S. (1987). Rapid passage of avian reovirus in one-day-old chicks. Clinical and virological findings. Avian Pathology, 16: 213-225.
13) KISARY, J. (1985). Experimental infection of chicken embryos and day-

old chichen with parvovirus of chicken origin. Avian Pathology, 14: 1-7.
14) KISARY, J., NAGY, B. AND BITAY, Z. (1984). Presence of parvoviruses in the intestine of chickens showing stunting syndrome. Avian Pathology, 13: 339-343.
15) KOUWENHOVEN, B., VERTOMMEN, M.H. AND VAN ECK, J.H.H. (1978a). Runting and leg weakness in broilers: involvement of infectious factors. Veterinary Science Communications, 253-259.
16) KOUWENHOVEN, B., DAVELAAR, F.G. AND VAN WALSUM, J. (1978b). Infectious proventriculitis causing runting in broilers. Avian Pathology, 7: 183-187.
17) KOUWENHOVEN, B., VERTOMMEN, M.H. AND GOREN, E. (1983). Runting and stunting syndrome in broilers. The disease with many names and faces. In: Disease Prevention and Control in Poulty Production, pp. 73-96. Edited by Hungerford, T.G. Sydney: University Press.
18) MC FERRAN, J.B. MC NULTY, M.S., MC CRACKEN, R.M. AND GREENE, J. (1983). Enteritis and associated problems. In: Disease Prevention and Control in Poultry Production pp. 129-138. Edited by Hungerford, T.G. Sidney: University Press.
19) MC FERRAN, J.B. AND MC NULTY, M.S. (1986). Recent advances in enterovirus infections of birds. In: Acute virus infections of poultry, pp. 195-202. edited by Mc Ferran, J.B. and Mc Nulty, M.S. Brussels Martinus Nijhoff.
20) MC NULTY, M.S., CURRAN, W.L., TODD, D. AND MC FERRAN, J.B. (1979). Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. Avian Pathology, 8: 239-247.
21) MC NULTY, M.S., ALLAN, G.M., CONNOR, T.J., MC FERRAN, J.B. AND MC CRACKEN, R.M. (1984). An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. Avian Pathology, 13: 429-439.
22) MC NULTY, M.S., ALLAN, G.M. AND MC FERRAN, J.B. (1987). Isolation of a novel avian entero-like virus. Avian Pathology, 16, 331-337.
23) MAEDA, M., IMADA, T., TANIGUCHI, T. AND HORIUUHI, T. (1979). Pathological changes in chicks inoculated with the picornavirus «Avian Nephritis Virus». Avian Diseases, 23: 589-596.
24) MARTLAND, M.F. AND FARMER, H. (1986). Pancreatic duct obstruction in stunting syndrome of broiler chickens. Veterinary Record, 118: 531-534.
25) MEULEMANS G., ANTOINE, O. AND HALEN, P. (1978). Préparations d'antisérums conjugués à la fluorescéine pour le diagnostic des principaux virus aviaires. Annales de Médecine Vétérinaire, 122: 45-50.
26) MEULEMANS, G., FROYMAN, R., AND HALEN, P. (1980). Epidémiologie

des maladies virales des poulets de chair. 1. Les affections à réovirus. Annales de Médicine Vétérinaire, 124: 513-519.
27) MEULEMANS, G., PEETERS, J.E. AND HALEN, P. (1985). Experimental infection of broiler chickens with rotavirus. British Veterinary Journal, 141: 69-73.
28) MEULEMANS, G., DECAESSTECKER, M., AND CHARLIER, G. (1986). Runting syndrome in broiler chickens. Experimental reproduction studies. In: Acute virus infections of poultry, pp. 179-189. Edited by Mc Ferran, J.B. and Mc Nulty, M.S. Brussels Martinus Nijhoff.
29) NERSESSIAN, B.N. GOODWIN, M.A., PAGE, R.K., KLEVEN, S.H. AND BROWN, J. (1986). Studies on orthoreoviruses isolated from young turkeys. III. Pathogenic effects in chicken embryos, chicks, poults and suckling mice. Avian Diseases, 30: 585-592.
30) PAGE, R.K., FLETCHER, O.J., ROWLAND, G.N., GAUDRY, J. AND VILLEGAS, P. (1982). Malabsorption syndrome in broiler chickens. Avian Diseases, 26: 618-624.
31) PASS, D.A., ROBERTSON, M.D. AND WILCOX, G.E. (1982). Runting syndrome in broiler chickens in Australia. Veterinary Record, 110: 386-387.
32) RANDALL, C.J., WYETH, P.J. AND HIGGINS, R.J. (1981). Pancreatic lesions in stuntend broilers. Veterinary Record, 109: 125-126.
33) REECE, R.L., HOOGER, P.T., TATE, S.H., BEDDOME, V.D., FORSYTH, W.M., SCOTT, P.C. AND BARR, D.A. (1984). Field, clinical and pathological observations of a runting and stunting syndrome in broilers. Veterinary Record, 115: 483-485.
34) RIDDEL, C. AND DEROW, D. (1984). Infectious stunting and pancreatic fibrosis in broiler chickens in Saskatchewan. Avian Diseases, 29: 107-115.
35) SINCLAIR, A.J., EMBURY, D.H., SMART, I.J., BARR, D.A., REECE, R.L. HOOPER, P.T. AND GOULD, J.A. (1984). Pancreatic degeneration in broilers with runting and stunting syndrome. Veterinary Record, 115: 485-488.
36) SPACKMAN, D., GOUGH, R.E., COLLINS, M.S., AND LANNING, D. (1984). Isolation of an enterovirus-like agent in the meconium of dead-in-shell chicken embryos. Veterinary Record, 114: 216-218.
37) VAN DER HEIDE, L., LUTTICKEN, D. AND HORZINEK, M. (1981). Isolation of avian reovirus as a possible agent of osteoporosis («brittle bone disease»; «femoral head necrosis») in broiler chickens. Avian Diseases, 25: 847-856.
38) VERTOMMEN, M., VAN ECK, J.H.H., KOUWENHOVEN, B AND VAN KOL, N. (1980). Infectious stunting and leg weakness in broilers: 1 Pathology

and biochemical changes in blood plasma. Avian Pathology, 9: 133-142.
39) WYETH P.J., CHETTLE, N.J. AND LABRAM, J. (1981). Avian Calicivirus. Veterinary Record, 109: 477.
40) WYETH, P.J. AND CHETTLE, N.J. (1985). Infectious stunting syndrome: evidence of vertical transmission. Veterinary Record, 117: 465-467.
41) YAMAGUCHI, S., IMADA, T. AND KAWAMURA, H. (1979). Characterization of a picornavirus isolated from broiler chicks. Avian Diseases, 23: 571-581.
42) YASON, C.V. AND SCHAT, K.A. (1986). Experimental infection of specific-pathogen-free chickens with avian rotaviruses. Avian Diseases, 30: 551-556.

DON REYNOLDS

RICERCHE SULL'ENTERITE VIRALE DEL TACCHINO

Veterinary Medical Research Institute
College of Veterinary Medicine
Iowa State University
Ames, Iowa 50010

Negli ultimi anni è stata segnalata un'infezione di tipo enterico che colpisce i tacchini nelle prime settimane di vita (1). Questa manifestazione, inizialmente osservata in allevamenti intensivi, con buona conduzione manageriale, venne denominata «enterite aviare». Le prime ricerche associarono alcuni virus a questa sindrome riscontrata in volatili affetti da enterite, così che assunse la denominazione di «enterite virale del tacchino» o semplicemente «enterite virale».

La sintomatologia clinica secondo alcuni AA appare lievemente diversificata, tuttavia, nella maggior parte dei casi, presenta caratteristiche comuni. La malattia, nella sua forma tipica, colpisce i volatili entro le prime 2 settimane di vita ed è caratterizzata dalla comparsa di diarrea; gli animali si presentano irrequieti, ritardano la crescita, riducono l'assunzione dell'alimento mentre incrementano l'assunzione dell'acqua (1,2). Alla sintomatologia clinica segue un ridotto sviluppo del piumaggio con particolare riguardo alle remiganti, che assumono il tipico aspetto di «penne ad elicottero» (2). All'esame necroscopico gli animali colpiti presentano dilatazione del tratto intestinale contenente fluidi e gas, atonia, mentre il cieco si presenta dilatato e contenente materiale schiumoso. Negli allevamenti di tacchini è stato riscontrato l'aumento della mortalità, tuttavia anche la morbilità, caratterizzata da diminuzione della crescita e da disuguaglianza nello sviluppo, è causa di notevoli perdite economiche. Generalmente gli animali colpiti, una volta superata l'infezione, non recuperano e rimangono in condizioni precarie per tutta la durata della loro vita economica. A causa delle perdite determinate dalla morbilità, quest'infezione riveste un ruolo economico di rilievo nell'industria dell'allevamento del tacchino. Negli ultimi anni la malattia ha assunto un'importanza sempre più rilevante negli Stati Uniti. A titolo esempli-

ficativo, nel 1987, l'Associazione Americana dei Patologi Aviari (AAAP), comitato consultivo dello stato sanitario dei volatili, ha segnalato il ruolo predominante svolto dalla malattia, comunemente nota come «enterite virale» o «enterite virale del tacchino», rendendola oggetto di ricerche prioritarie nel quadro delle infezioni enteriche del tacchino (3). La malattia è ampiamente diffusa negli Stati Uniti ed è causa di ingenti danni economici negli allevamenti intensivi moderni, caratterizzati da una buona conduzione manageriale. Una ricerca condotta su 435 allevamenti dell'Iowa, nel 1988 ha evidenziato come il 37,9% era venuto in contatto con l'agente eziologico dell'enterite virale (4).

Da osservazioni e risultati di ricerche sperimentali è stata messa in evidenza la natura infettiva di questa malattia, sebbene non possa essere completamente escluso l'intervento di agenti non infettanti (2). Poiché l'agente eziologico causale non è stato riconosciuto in alcuno dei microrganismi enteropatogeni noti, i Ricercatori hanno volto l'attenzione a virus ed ad altri agenti associati a questa sindrome, con successiva evidenziazione di numerosi agenti virali.

I virus che più frequentemente sono stati isolati ed identificati negli animali affetti da «enterite virale» sono rappresentati da reovirus (5,6), rotavirus (6,7,8), virus simili ai rotavirus (rotavirus-like) (RVLVs) (6,7) e astrovirus (1,6,7). Gli astrovirus ed i rotavirus-like sono stati evidenziati con maggiore frequenza rispetto agli altri virus descritti nel corso dell'«enterite virale del tacchino» (6,7). Solo saltuariamente questi agenti virali si riscontrano singolarmente mentre si evidenziano con maggiore frequenza associati tra loro (7). Da una ricerca si è stabilito che la combinazione astrovirus e rotavirus-like (RVLVs) si manifestava con una incidenza superiore rispetto ad altre combinazioni. Questo studio ha consentito di comprendere l'eziologia di quei focolai di enterite virale del tacchino in cui non era stato evidenziato alcun agente enteropatogeno noto. In una ricerca condotta presso il nostro laboratorio, sono stati esaminati campioni, provenienti da oltre 200 allevamenti di tacchini, nei confronti di enteropatogeni. I campioni erano prelevati da animali che avevano presentato manifestazioni enteriche. Si è inoltre stabilito che il 62% degli allevamenti presentava infezioni sostenute da virus enterici, il il 36% sostenute da Salmonella, il 16% era infestato da coccidi (Eimeria spp.), lo 0,7% era positivo

nei riguardi dei criptosporidi mentre il 26% era negativo. Il 51% degli allevamenti era positivo nei riguardi di rotavirus, il 34% nei riguardi di astrovirus ed il 2% di reovirus. I rotavirus evidenziati nel corso di queste sindromi appartenevano ai gruppi A e D e venne pure riscontrato un ulteriore stipite non classificato ed identificabile come rotavirus atipico.

Attualmente la classificazione dei rotavirus del tacchino non è stata completamente definita. Uno dei criteri di tipizzazione seguiti riguarda la suddivisione dei rotavirus in gruppi (9), sulla base delle correlazioni antigeniche fra loro esistenti (valutate in prove sierologiche) e sulle differenze elettroferotipiche (determinate mediante elettroforesi degli 11 segmenti del genoma di tipo RNA bicatenario dei rotavirus). In accordo a tali criteri sono stati identificati 3 gruppi distinti di rotavirus del tacchino (7,10). Gli stipiti isolati da questa specie di volatili appartengono al gruppo A (6,11), posseggono un antigene di gruppo comune a tutti i rotavirus delle varie specie animali e sono stati coltivati in vitro (11). I rotavirus-like (RVLVs) del tacchino sono stati classificati nel gruppo D (12) che, fino al momento attuale, comprende esclusivamente rotavirus delle specie aviare (9). Non è stata riportata alcuna segnalazione circa la coltivazione di questi rotavirus nei sistemi *in vitro*. Un altro stipite di rotavirus isolato da questa specie animale e non appartenente al gruppo A o D è stato riscontrato con frequenza molto limitata (7,10). Questo stipite (comunemente designato rotavirus atipico) non è ancora stato incluso in alcun gruppo.

Ricerche sulla patogenesi condotte nei mammiferi con rotavirus di tipo A hanno evidenziato la loro capacità di penetrazione ed infezione degli enterociti differenziati nei villi del piccolo intestino (13). La replicazione virale avviene nel citoplasma di queste cellule ed è causa della perdita delle loro capacità di digestione e assorbimento con conseguenti alterazioni di tale gravità da indurne la morte (13). La diarrea è l'esito della variazione della pressione osmotica per la presenza, in elevate concentrazioni, di elementi (carboidrati) indigeriti e quindi non assorbiti. Un meccanismo patogenetico simile è stato riportato per l'infezione negli ovini sostenuta da astrovirus, che replicano nelle cellule epiteliali colonnari del piccolo intestino, deputate all'assorbimento (14).

Gli astrovirus nel bovino invece, inoculati in animali gnotobiotici non erano in grado di indurre alcuna manifestazione clinica (15). Quando invece i vitelli venivano inoculati con astrovirus associati a rotavirus o con astrovirus associati a breda virus, si aveva la comparsa della manifestazione enterica in forma grave (15). Gli astrovirus si sono dimostrati in grado di infettare le cellule epiteliali di rivestimento delle placche del Peyer (15). Si è supposto che l'infezione da astrovirus comprometta il meccanismo di presentazione dell'antigene dalle cellule epiteliali apicali al tessuto linfoide sottostante, ritardando di conseguenza e/o interferendo con la risposta immunitaria nei riguardi degli enteropatogeni (rotavirus) (15).

Vari AA hanno condotto ricerche sulla patogenesi di astrovirus (16), del gruppo A di rotavirus (17) e reovirus (5,18). Gli astrovirus sono apparsi in grado di infettare i volatili e di indurre la comparsa di diarrea riducendo l'incremento ponderale e l'assorbimento di D-xilosio a livello intestinale dando esito a lesioni identiche a quelle riscontrate nel corso «dell'enterite virale» (16). Alla stessa stregua i rotavirus del gruppo A sono apparsi capaci di indurre infezione enterica nei volatili (17). Nel lavoro citato (17) viene riportato che in seguito all'infezione con rotavirus del gruppo A si osservano sia animali con diarrea profusa che animali apparentemente normali. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che in condizioni sperimentali i reovirus possono indurre infezione nei volatili (5,18). È stato anche riportato che detti virus causano riduzione dell'assorbimento di D-xilosio alterandone il tempo di passaggio attraverso l'apparato gastrointestinale (3,15). Tuttavia questi lavori non segnalano la presenza di eventuali manifestazioni cliniche, variazione dell'incremento ponderale o altri elementi caratteristici «dell'enterite virale del tacchino». Non sono noti studi patogenetici con rotavirus del gruppo D. È stato solo riportato che l'infezione attuata con astrovirus in associazione a rotavirus del gruppo D dava esito ad infezione, con manifestazioni cliniche ed alterazioni patologiche più severe di quelle riscontrate in seguito alla sola infezione con astrovirus (19).

Sino al momento attuale non sono noti presidi immunizzanti, chemioterapici o altri mezzi efficaci per il controllo e/o la prevenzione «dell'enterite virale del tacchino». In linea generale si raccomanda una profilassi di tipo sanitario con miglioramento della conduzione mana-

geriale, pulizia, disinfezione e interruzione del ciclo di allevamento tra i vari gruppi. È comunque da puntualizzare che l'enterite virale del tacchino rappresenta un rischio elevato per i produttori che adottano sistemi di allevamento intensivi caratterizzati da un livello elevato di conduzione manageriale. Pertanto è evidente come questi sistemi di allevamento intensivo non siano sufficienti per controllare l'enterite virale del tacchino.

BIBLIOGRAFIA

1) SAIF, Y.M., D.L., REYNOLDS, L.J. SAIF, AND K.W. THEIL. Diarrhea, enteritis, malabsorption, makldigestion and viruses. Proc. 34th Western Poultry Dis. Conf. Univ. Calif. Davis, CA. 1985.
2) BRACEWELL, C.D. AND C.J. RANDALL. 1984. The infectious stunting syndrome. World's Poult. Sci. J. 40: 31-37.
3) AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS annual meeting newsletter. Poultry health research priorities-1987. June 19, 1987.
4) 1988 TURKEY HEALTH SURVEY OF IOWA MARKET TURKEYS. ISU Extension Service. Prepared by W.J. Owings.
5) GOODWIN, M.A., K.S. LATIMER, B.N. NERSESSION, AND O.J. FLETCHER. Quantitation of intestinal D-xylose in normal and reovirus inoculated turkeys. Avian Dis. 28:959,967. 1984.
6) SAIF, L.J., Y.M. SAIF, AND K.W. THEIL. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. Avian Dis. 29: 798-811. 1985.
7) REYNOLDS, D.L., Y.M. SAIF, AND K.W. THEIL. A survey of enteric viruses of turkey poults. Avian Dis. 31: 89-98. 1987.
8) BERGELAND, M.E., J.P. MC ADARAGH, AND I. Stotz. Rotaviral enteritis in turkey poults. Proc. 26th Western Poultry Dis. Conf., Univ. of Calif., Davis, CA 1977.
9) PEDLEY, S., J.C. BRIDGER, J.F. BROWN AND M.A. MC CRAE. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. J. Gen. Virol. 64: 2093-2101. 1983.
10) THEIL, K.W., D.L. REYNOLDS, AND Y.M. SAIF. Comparison of immune electron microscopy and genome electropherotyping for detection of turkey rotavirus and rotavirus-like in intestinal contents. J. Clin. Microbiol. 23:695-699. 1986.
11) THEIL, K.W. D.L. REYNOLDS, AND Y.M. SAIF. Isolation and serial propagation of turkey rotaviruses in a rhesus monkey kidney (MA 104) cell line. Avian Dis. 30: 93-104. 1986.
12) SAIF, Y.M., L.J. SAIF, K.W. THEIL AND D.L. REYNOLDS. Enteric Viruses of Turkeys In: Recent Advances in turkey science - 21st Poultry science symposium. Editor, C. Nixey and T.C. Grey. Butterworths Scientific Ltd. Guildford, Surrey, U.K. pp. 235-262. 1988.
13) ESTES, M.K., E.L. PALMER, AND J.F. OBIJESKI. Rotaviruses: a review. Current topics in Microbiology and Immunology. 105: 123-184.1983.
14) GRAY, E.W., K.W. ANGUS, AND D.R. SNODGRASS. Ultrastructure of the

small intestine in the astrovirus infected lambs. J. Clin. Virol. 49:71-82.1980.
15) WOOD, G.N., J.F. POHLENZ, N.E. KELSO GOURLEY, AND J.A. FAGERLAND. Astroviruses and breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. J. Clin. Microbiology. 19: 623-630.1984.
16) REYNOLDS, D.L. AND Y.M. SAIF. Astrovirus: A cause of an enteric disease in turkey poults. Avian Dis. 30: 728, 735, 1986.
17) YASON, C.V., AND K.A. SCHAT. Pathogenesis of rotavirus infection in turkey poults. Avian Path. 15: 421-435.1986.
18) GOODWIN, M.A., B.N. NERSESSION, J. BROWN, AND O.J. FLETCHER. Gastrointestinal transit times in normal and reovirus-inoculated turkeys. Avian Dis. 29: 920-928. 1985.
19) REYNOLDS, D.L., Y.M. SAIF, AND K.W. THEIL. Enteric viral infections of turkey poults: incidence of infection. Avian Dis. 31: 272-276. 1987.

S. PASCUCCI*, D. GELMETTI*, G. SIRONI**, A. LAVAZZA*

SINDROMI ENTERICHE DEI VOLATILI DA REDDITO: ESPERIENZE DI CAMPO E RILIEVI DI MICROSCOPIA ELETTRONICA

* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Brescia
** Istituto di Anatomia Parologica Veterinaria e Patologia Aviare
Facoltà di Veterinaria - Università di Milano

INTRODUZIONE ALLA SITUAZIONE ITALIANA

L'esistenza di particelle virali a tropismo intestinale è nota sin dagli anni '50 in patologia umana, ed in medicina veterinaria le prime segnalazioni sono di un decennio successivo. Le attuali conoscenze, frutto di approfondite ricerche in campo virologico e patogenetico, associano la presenza di differenti generi virali, quali enterolike-virus, picornavirus, reovirus, rotavirus, coronavirus, parvovirus, astrovirus, togalike-virus, adenovirus e calicivirus, a manifestazioni cliniche di enterite. Purtuttavia va sottolineato che, mentre il ruolo eziopatogenetico è conosciuto per alcuni di essi, per altri manca tutt'oggi la correlazione tra presenza e induzione di manifestazioni cliniche.

Le ricerche condotte parallelamente in patologia aviare non si discostano da quanto riportato nei mammiferi. L'osservazione, distribuita negli anni, di numerosi e gravi episodi di enteriti ad andamento epizootico interessanti la totalità dei volatili da reddito allevati intensivamente, induce a considerare queste patologie uno dei principali problemi sanitari nell'allevamento intensivo (Andral e Toquin, 1984a, b; Andral et al., 1985; Decaesstecker et al., 1986, 1988; Mc Nulty et al., 1979; Reynolds et al., 1987a, b; Saif et al., 1985):

Non va dimenticato che la produzione avicola, per il grande numero di animali allevati in spazi ridotti, per le tecniche esasperate di alimentazione e di selezione genetica tendenti alla massima produzione nel minor tempo, hanno creato condizioni favorevoli all'instaurarsi di questa patologia che incide fortemente sulla redditività dell'alle-

vamento, risultando in alcuni casi determinante per la sua sopravvivenza economica (Mc Ferran e Mc Nulty, 1986; Mc Ferran et al., 1983).

Tutte le specie aviarie da reddito presentano una varietà di forme enteriche caratterizzate da feci, da caso a caso liquide, schiumose, collose ecc., come pure numerosi sono i virus che, singolarmente od in associazione, possono essere osservati nel contenuto intestinale sia di animali apparentemente sani che ammalati. In alcuni casi queste forme enteriche vengono riconosciute quali entità patologiche definite e sono note con il termine di «enterite trasmissibile» come per il tacchino (Pomeroy, 1984). In altre specie la comparsa e l'evoluzione delle patologie enteriche non è fino ad ora stata esaurientemente spiegata dal punto di vista eziologico, tuttavia la similarità dei quadri clinici ed anatomo-patologici, nonché il carattere di rapida diffusione suggeriscono, anche per queste patologie, pure in assenza di un agente eziologico unico sempre individuabile, la dizione convenzionale di «enterite trasmissibile virale» al fine di sottolinearne i caratteri peculiari.

La malattia esordisce improvvisamente e si diffonde in pochi giorni alla totalità dei capi allevati che mostrano anoressia, penne arruffate, depressione del sensorio, perdita di peso spesso persistente (stunting) e valori percentuali di mortalità estremamente variabili. Si può osservare, inoltre, nei singoli capi colpiti, difficoltà di movimento con conseguente incapacità di raggiungere le mangiatoie per cui, il più delle volte, ne deriva l'ingestione di frammenti della lettiera. Negli stadi finali della malattia, probabilmente a causa dell'intensa diarrea che induce disidratazione e perdita di ioni Na+ e K+, si osservano sintomi nervosi caratterizzati da ospitotono, torticollis, atassia e ribaltamento laterale.

Le lesioni anatomo-patologiche sono localizzate al tratto enterico e mostrano anse intestinali dilatate specialmente nell'intestino tenue, ectasia dei ciechi con assottigliamento della parete, contenuto fluido frammisto a bolle di gas. Il ventriglio contiene spesso frammenti di lettiera e talvolta presenta erosioni dell'epitelio.

Le lesioni istologiche, sempre modeste e limitate all'intestino, sono caratterizzate, come nella maggior parte delle enteriti catarrali, da edema della sottomucosa, particolarmente evidente a livello cieca-le, scarsi infiltrati linfocitari nell'asse dei villi ed epitelio di rivestimento di aspetto cubico. La sottomucosa mostra ectasia dei linfatici.

L'evoluzione cronologica delle patologie enteriche, che si sono diffuse negli allevamenti avicoli a carattere intensivo in special modo nelle regioni del nord Italia, ove più sviluppata è l'avicoltura, possono essere così di seguito descritte.

Verso la fine degli anni '50 un'enterite con i caratteri precedentemente riportati era rilevabile unicamente negli allevamenti di tacchini e colpiva animali di 10-20 giorni di età; questa patologia veniva comunemente confusa con la tricomoniasi o l'examitiasi e, solo in un tempo successivo, le sue caratteristiche vennero correlate all'enterite da coronavirus, già largamente diffusa negli U.S.A. (Pomeroy e Sieburth, 1953).

Nel 1960 esordì negli allevamenti di galline faraone una patologia allora denominata «enterite trasmissibile» (Pascucci et al., 1970; Misciattelli et al., 1981). La malattia colpiva gli animali nei primi giorni di vita ed era caratterizzata da rapido decorso ed elevata mortalità (100% in 5 giorni). I tacchini, i pulcini, gli anatroccoli ed i fagiani risultarono resistenti sia all'infezione naturale sia a prove di infezione sperimentale. L'evoluzione di questa enterite negli allevamenti di faraone si modificò con il passare degli anni e risultò interessare animali di 2 settimane di età che presentavano lieve enterite e mortalità inferiore al 5% o anche assente se la gestione aziendale era corretta sotto il profilo igienico-sanitario. La maggiore resistenza osservata nel corso degli anni negli animali provenienti da linee selezionate sul territorio nazionale contrastava con la sensibilità osservata in faraone di importazione (Paesi dell'Est). In questi animali la mortalità era del 30-40% indipendentemente dall'età dei soggetti importanti. Sembrò, pertanto, ipotizzabile l'acquisizione nei nostri animali di uno stato immunitario di protezione, nonché l'esistenza di portatori-eliminatori nei soggetti apparentemente guariti da almeno 5 mesi (Pascucci, osservazioni personali).

Nel 1971 un enterite, ad andamento ed evoluzione simile alla malattia osservata nelle faraone, comparve negli allevamenti di fagiani (Maestrini et al., 1973); gli animali erano colpiti entro le due settimane di vita con indice di mortalità variabile dal 20 al 55%. Le prove di infezione sperimentale nel pulcino, nel tacchino, nella faraona, nella starna, nella pernice e nella coturnice non hanno permesso di riprodurre la malattia (Pascucci, osservazioni personali).

Nel 1979 Govoni e Maestrini segnalarono nella starna e nella pernice rossa allevate intensivamente la comparsa di una forma enterica ad andamento acuto, causa di elevata mortalità nella prima settimana di vita (Maestrini et al., 1988).

Agli inizi degli anni '80 si osservò una malattia con sintomi enterici che colpiva gli allevamenti di polli a diversa destinazione e interessava pulcini di 7-15 giorni di età. I dati relativi alla morbilità ed alla mortalità risultarono difficilmente quantificabili in quanto il sintomo enterite veniva correlato alle fasi di esordio della sindrome da malassorbimento che, proprio in quegli anni, era presente negli allevamenti italiani causando gravi danni economici.

Negli stessi anni fu possibile osservare in gruppi di tacchini di età variabile gravi episodi di enterite con punte di mortalità del 25-30%. Questa patologia, nettamente distinguibile dalla enterite emorragica da adenovirus, colpiva anche soggetti di 2-3 mesi di età ed era caratterizzata da decorso prolungato nel tempo (Pascucci, osservazioni personali).

Attualmente le sindromi enteriche negli allevamenti intensivi sono ancora significativamente presenti in tutte le specie allevate, e si sono estese anche agli allevamenti di quaglie giapponesi, mantenendo inalterate le caratteristiche cliniche ed anatomo-patologiche descritte; per contro la sindrome da malassorbimento sembra in netta diminuzione, anche in virtù dell'adozione di più accurati programmi di gestione aziendale e di igiene ambientale.

Vengono riportati i risultati di tre esperienze, diverse per le caratteristiche di approccio di indagine, ma assimilabili in quanto tese ad approfondire l'eziologia delle sindromi enteriche. Esse riguardano:

– un'indagine di Microscopia Elettronica (M.E.) relativa a sei anni di studio realizzata allo scopo di valutare la presenza e l'incidenza di virus enterici in corso di episodi conclamati di enterite in alcune specie aviarie (pollo, faraona, tacchino, fagiano, quaglia, starna, anatra), campionando feci e/o contenuto intestinale di animali mostranti sintomatologia clinica in atto.

– Una prova di campo su di un gruppo di 512 faraone, seguite dalla schiusa fino al 35° giorno di vita in stretto controllo igienico-sanitario, eseguita per valutare attraverso periodiche osservazioni cliniche ed anatomo-patologiche l'insorgenza ed il decorso di forme enteriche

quali l'«enterite trasmissibile», nonché per accertare con controlli di M.E. del contenuto intestinale la presenza di particelle virali.

– Il controllo di alcuni gruppi di polli da carne provenienti da allevamenti intensivi in varia misura colpiti, in cicli precedenti, da sindrome da malassorbimento. Il contenuto intestinale di pulcini, di età compresa tra gli 1 ed i 20 giorni, era periodicamente prelevato e controllato al M.E. in colorazione negativa, per valutare la presenza di virus enterici.

Rilievi di Microscopia Elettronica

Sono stati presi in esame 530 volatili provenienti da 365 allevamenti di tipo intensivo ubicati in diverse regioni del Nord Italia, che presentavano la sintomatologia clinica già descritta; gli animali sono stati suddivisi per età, ove riferito il dato, e per specie di appartenza come riportato nelle tabelle 1 – 6.

Il campionamento ha riguardato porzioni intestinali e/o feci fluide di soggetti con sintomatologia in atto, prelevate in contenitori sterili e conservate a – 20° C fino al momento dell'invio al Laboratorio di Microscopia Elettronica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia di Brescia.

Il contenuto intestinale e le feci subivano dei trattamenti di scongelamento e congelamento, di diluizione (1:5) in acqua distillata, di doppia centrifugazione e di chiarificazione al fine di eliminare i detriti più grossolani; 75 µl del sovranatante così ottenuto venivano pellettati direttamente, utilizzando un'ultracentrifuga «Airfuge Beckman», su griglie di rame da 300 mesh precedentemente rivestite da Formvar (0.8% in cloroformio) ed alloggiate in specifici adapters posti in microprovette da 100 µl (Misciattelli et al., 1980). Le griglie così allestite venivano colorate negativamente con acido fosfotungstico (NaPt) 2%, pH 7,2, per circa 1,5 min. ed osservate utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione operante ad 80 kV e ad ingrandimenti variabili tra 19.000 e 46000 x. Venivano considerate negative le griglie che non presentavano alcuna particella virale dopo l'osservazione di non meno di 10 mesh. L'identificazione degli agenti virali osservati è stata effettuata sulla base delle dimensioni e delle caratte-

ristiche morfologiche delle particelle. Per quanto riguarda il genere rotavirus, l'appartenenza al gruppo A è stata determinata con un sistema immunoenzimatico del commercio (Rotazyme II, Abbott).

L'osservazione al M.E. dei 530 campioni esaminati evidenzia la presenza di particelle virali in 292 di essi, pari al 55,1% (tab. 1); i dati riassuntivi della positività in relazione ai tipi virali osservati sono desumibili dalla tabella 2.

I campioni esaminati risultano positivi per un solo tipo di virus nell'81,5%, mente nel 18,5% dei campioni si osserva la presenza di due o più tipi virali in associazione.

L'osservazione più frequente si riferisce a particelle virali delle dimensioni comprese fra 22 e 30 nm, assimilabili agli enterovirus, che rappresentano il 42,45% della positività totale (tab. 3).

Sono state inserite in questo gruppo virale tutte quelle particelle che presentavano morfologia e dimensioni riferibili alla famiglia Picornaviridae e comprendenti virus descritti in letteratura come pseudopicornavirus, astrovirus, calicivirus, enterovirus-like, small round particles (Andral et al., 1984; Appleton, 1987; Mc Nulty et al., 1980; Reynolds et al., 1986; Wyeth et al., 1981); in 3 soli casi le particelle virali osservate sono state ulteriormente classificate astrovirus-like per la nitidezza dell'immagine ultramicroscopica.

Le analisi dei risultati di M.E. differenziati per specie permette di rilevare che l'incidenza di enterovirus-like era particolarmente elevata nelle galline faraone (37,4%), nei polli (24,75%) e nei tacchini (26,65%) (tab. 3).

Il secondo gruppo virale per numerosità è quello dei rotavirus (25,65%): di 106 campioni in cui erano osservabili particelle morfologicamente riferibili a rotavirus, il 40,55% è risultato appartenere al gruppo A (tab. 4). La percentuale di positività del 13,25% nei polli risulta leggermente inferiore a quanto riferito da Mc Nulty et al., 1979; mentre i valori percentuali di positività nei fagiani (46,15%), nelle starne (20%) e nelle quaglie giapponesi (33,3%) sono risultati elevati. La mancanza di segnalazioni riguardanti i rotavirus della quaglia non ci permette di confrontare i nostri risultati con quelli di altri Autori, ma anzi suggerisce la necessità di approfondirne ulteriormente il ruolo patogeno e la diffusione nell'allevamento intensivo (Barnes, 1987).

Si osserva ancora che, limitatamente alla specie tacchino, i risultati relativi al genere rotavirus hanno mostrato la presenza di particelle, ad eccezione di un caso, sempre in associazione ad altri tipi morfologici (coronavirus, enterovirus); inoltre la registrazione del valore percentuale di positività (10,9%) si discosta da quanto osservato da altri Autori (Mc Nulty et al., 1979; Reynolds et al., 1987a, b; Saif et al., 1985).

L'osservazione di altri virus, quali reovirus, adenovirus, herpesvirus, parvovirus, coronavirus non ha fornito valori percentuali significativi (tab. 3). La segnalazione della loro presenza anche da parte di altri Autori (Kisary et al., 1984; Mc Nulty et al., 1979; Nersessian et al., 1985; Reynolds et al., 1987a; Saif et al., 1985; Yason et al., 1987; Yates et al., 1976) non pare comunque direttamente legata ad enteriti specifiche, se non per i coronavirus e gli adenovirus del tacchino (Saif et al., 1985).

Ugualmente non significativa è da ritenersi l'osservazione di particelle virali diverse in associazione. La loro distribuzione in relazione alla specie è desumibile dalla tabella 5. Inoltre in 3 campioni si è riscontrata la contemporanea presenza di 3 tipi morfologici: rispettivamente rota-entero-paramixovirus (pollo), rota-corona-paramixovirus (pollo) e rota-corona-parvovirus (fagiano). La percentuale di positività in relazione alla specie considerata (tab. 3) risulta particolarmente elevata nei fagiani (17,95%), nei tacchini (16,35%) e nelle faraone (16,2%).

Vorremmo inoltre segnalare la presenza di particelle simil-virali di aspetto bastoncellare osservate in 3 campioni (1 starna, 2 faraone) e con morfologia sovrapponibile a quanto riportato da Collins et. al. (1988).

Nella tabella 6 vengono riportati i dati relativi all'età di 459 soggetti conferiti al nostro laboratorio con un'anamnesi completa; l'analisi di questi dati indica una maggiore incidenza delle enteriti per i polli e i tacchini di età compresa fra i 7 ed i 14 giorni, per le faraone in soggetti fra i 15 e i 21 giorni; per le starne, le quaglie e le anatre il ridotto numero di campioni non suggerisce alcuna incidenza significativa; mentre per quanto riguarda l'età dei fagiani le nostre osservazioni si riferiscono quasi esclusivamente a soggetti di età inferiore ai 21 giorni (tab. 6).

Prova di campo sull'«Enterite Trasmissibile» della Gallina Faraona

A partire dalla schiusa 512 faraoncine furono alloggiate in un piccolo capannone, preventivamente pulito e disinfettato, ove in precedenza non erano mai stati allevati volatili. La temperatura era controllata e mantenuta a 27-30° C per la durata del ciclo produttivo; l'acqua proveniva dal pozzo aziendale ed il mangime era fornito dal mangimificio aziendale.

Il personale addetto alle cure degli animali indossava, prima dell'ingresso nel capannone, tute, cappello e stivali, che successivamente riponeva in un locale disinfettato giornalmente antistante il capannone stesso*.

Nessun trattamento farmacologico venne effettuato durante tutto il periodo di osservazione.

Ad intervalli variabili (1-5-8-12-16-22-28 gg) vennero eseguiti prelievi del contenuto intestinale di alcuni soggetti e si allestirono dei preparati per l'osservazione al M.E. come precedentemente descritto.

Nonostante il rigore delle precauzioni igieniche ed il controllo della temperatura ambientale alla 12° giornata comparve un'enterite ad alta morbilità, accompagnata da sintomatologia depressiva e quadro anatomo-patologico riportabile all'«enterite virale trasmissibile». La mortalità risultò contenuta (3/512); le manifestazioni cliniche durarono fino al 16° giorno, poi scomparvero. L'indagine di M.E. evidenziava la presenza di numerose particelle virali enterovirus-like nel contenuto intestinale degli animali esaminati in 12° e 16° giornata.

In 28° giornata si verificò un riacutizzarsi della enterite, gli animali presentarono diarrea e lesioni tipiche in assenza, peraltro, di sintomi depressivi. Al M.E. fu possibile evidenziare particelle riferibili a rotavirus in associazione ad enterovirus-like.

Gli animali superarono anche questo secondo episodio enterico e a 35 gg. fecero registrare un consumo di alimento ed un incremento ponderale in linea con le tabelle della razza (tab. 7).

Ci sembra possibile ipotizzare che il ricovero ove erano alloggiati i pulcini non sia imputabile di contaminazione sia perché non erano stati allevati animali in precedenza sia a causa dei trattamenti disinfettanti eseguiti; piuttosto le fonti d'infezione sembrano individuabili

nell'incubatoio, al momento della schiusa, o nella madre, quale espressione di trasmissione verticale.

Si osserva peraltro che la severa profilassi igienica, la corretta conduzione manageriale, in assenza di trattamenti terapeutici, hanno permesso di registrare un contenuto indice di mortalità (0,6%) e di portare il gruppo a fine ciclo con buone rese produttive.

Osservazioni Generali sulla Sindrome da Malassorbimento

Lo studio è stato svolto su 6 differenti gruppi di pulcini, 4 dei quali provenienti da allevamenti industriali colpiti, in precedenti cicli, da sindrome da malassorbimento ed altri due, utilizzati come gruppi di controllo, alloggiati rispettivamente in un allevamento mai interessato da sindrome da malassorbimento ed in un isolatore Montair. Al fine di verificare l'eventuale presenza di virus enterici negli animali di tali gruppi, il contenuto intestinale di un numero variabile di soggetti veniva prelevato e trattato come più sopra riportato per l'allestimento di preparati elettronmicroscopici in colorazione negativa. Più in dettaglio, lo studio è stato condotto in due successive prove. La prima prova è stata realizzata su tre gruppi (A-B-C), provenienti da allevamenti di broiler di uno stesso complesso industriale in precedenza colpiti da sindrome da malassorbimento. Di tali gruppi veniva raccolto ogni due giorni, tra il primo e l'undicesimo giorno di vita, il contenuto ciecale di 6 pulcini, nel gruppo A, o di 3 pulcini, nei gruppi B e C , scelti, quando presenti, tra i soggetti con sintomatologia conclamata.

Nella seconda prova pulcini di una stessa schiusa sono stati alloggiati rispettivamente 1) in un allevamento colpito nei cicli precedenti da sindrome da malassorbimento e sottoposto, alcuni giorni prima dell'immissione dei pulcini, a disinfezione mediante nebulizzazione con soluzione di formalina al 10% (gruppoD); 2) in un allevamento mai colpito in precedenza da sindrome da malassorbimento e da tempo sottoposto a disinfezioni di fine ciclo analoghe a quanto riportato per il gruppo D (gruppo E); 3) in un isolatore Montair (gruppo F).

Sei (gruppo D), tre (gruppo E) e due (gruppo F) pulcini scelti tra i soggetti di scarto erano sacrificati ad 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 20 giorni di vita e ne veniva prelevato il contenuto intestinale. Di tutti i gruppi

il materiale prelevato veniva trattato per l'osservazione al M.E. in colorazione negativa secondo la metodica più sopra descritta.

Dei gruppi provenienti dagli allevamenti (A-E) veniva inoltre registrata l'eventuale comparsa di sintomi o lesioni riferibili a sindrome da malassorbimento e, a fine ciclo (42 gg), la percentuale globale di soggetti morti e/o scartati.

Nella prima prova, la presenza di sintomi (diarrea acquosa e schiumosa e, a partire dal 12°-14° giorno di vita, stentata crescita e difetti di impiumagione) e di lesioni (proventricolite, entero-tiflite catarrale, sclero-atrofia pancreatica associate, talora, ad ipotrofia degli organi linfatici) riferibili a sindrome da malassorbimento era rilevata in tutti tre i gruppi.

I risultati delle indagini di M.E. di tale prova sono riportati nelle tabelle 8-9-10. Enterovirus-like e rotavirus, singolarmente od in associazione tra loro, sono stati gli unici virus rilevati. Enterovirus-like erano presenti fin dal 5° giorno in un limitato numero di campioni nei gruppi A e C; già dal 7° giorno, però, la presenza di tali virus è andata estendendosi alla quasi totalità dei campioni esaminati di tutti e tre i gruppi persistendo, seppure in un più limitato numero di campioni, fino al 9° (gruppo B) o all'11° (gruppi A e C) giorno. Rotavirus sono invece stati riscontrati a partire dal 7° (gruppo A) o dal 9° (gruppi B e C) giorno in associazione ad enterovirus-like o, più di rado, singolarmente.

Notevolmente differente risultava, però, la quantità di particelle virali presenti nei campioni dei tre gruppi. Mentre per il gruppo A esse erano quantificabili nell'ordine delle 10-20 particelle/mesh per gli enterovirus-like e di 1-5 particelle/mesh per i rotavirus, il numero di particelle/mesh saliva, nei gruppi B e C, a valori di 50-150 per gli enterovirus-like e 30-150 per i rotavirus. Valori quantitativamente maggiori sono però stati sempre rilevati nel gruppo C rispetto al gruppo B.

A tali notevoli differenze quantitative nei reperti elettronmicroscopici dei tre gruppi, facevano riscontro differenti valori di mortalità e scarto, sempre correlati con la maggiore o minore quantità di particelle virali presenti e corrispondenti al 7,5% (gruppo A), all'11,2% (gruppo B) ed al 16,4% (gruppo C).

Nella seconda prova, sporadici casi di onfalite e, più tardivamente,

di pericardite e peripatite fibrinosa riferibili a colibacillosi, sono stati osservati prevalentemente nel gruppo D. In nessuno dei tre gruppi (D-E-F) sono stati riscontrati sintomi e lesioni riferibili a sindrome da malassorbimento.

Le tabelle 11-12-13 riassumono i risultati delle osservazioni di M.E. effettuate sui gruppi D-E-F. Particelle virali erano presenti esclusivamente nei gruppi D ed E. In quest'ultimo, il reperto era limitato ad un solo campione, prelevato in 8ª giornata, nel quale erano presenti in numero contenuto enterovirus-like. Nel gruppo D, invece, tali virus erano stati riscontrati a 6, 8, 13, 15 giorni di vita rispettivamente con 4/6, 3/6, 1/6 e 1/6 campioni positivi. Sempre nel gruppo D, 4 dei 6 campioni prelevati a 20 giorni di età contenevano reovirus in quantità relativamente elevata (5-20 particelle/mesh). Sempre modesto, ed assai lontano dai valori rilevati nei gruppi della prima prova, appariva il numero di particelle/mesh nei campioni positivi per enterovirus-like.

Tutti i campioni del gruppo F mantenuto in isolatore risultavano, invece, negativi.

Le percentuali di animali morti o scartati, calcolate a fine ciclo, risultavano del 4,5% nel gruppo D e del 2,1% nel gruppo E. Non è stato registrato, invece, alcun caso di morte tra gli animali del gruppo F.

L'esame al M.E. del contenuto intestinale dei 160 soggetti delle due presenti prove ha consentito di rilevare la presenza di enterovirus-like, di rotavirus e reovirus. Nei gruppi A-B-C, i soli ad avere manifestato sintomi e lesioni riconducibili a classiche forme di sindrome da malassorbimento, erano osservati, singolarmente od in associazione, enterovirus-like e rotavirus. La loro costante comparsa nel contenuto intestinale dei pulcini, 5-7 giorni prima del manifestarsi dello «stunting» e delle alterazioni dell'impiumagione, nonché la notevole correlazione tra il numero di particelle presenti e la gravità della forma clinica (misurata sulla base della percentuale di mortalità e, soprattutto, di soggetti scartati) inducono a sospettare un loro coinvolgimento nella sindrome in questione.

Enterovirus-like erano osservati, anche nella seconda prova nei gruppi D-E, gruppi nei quali non erano tuttavia evidenziabili sintomi o lesioni riferibili a sindrome da malassorbimento. Il modesto numero di particelle presenti nei campioni di tali gruppi potrebbe spiegare la

mancata insorgenza della malattia, avvalorando ulteriormente l'ipotesi che la comparsa di sintomi e lesioni, qualora sia legata esclusivamente ad infezioni da enterovirus-like, richieda infezioni particolarmente massive (tab. 14).

Osservazioni Conclusive

L'esposizione cronologica della situazione italiana e le osservazioni della realtà attuale riservano alle sindromi enteriche un ruolo importante, se non primario, quale causa di mancate rese produttive. Risulta, inoltre, evidente che un'entità patologica nota come "enterite trasmissibile virale", con le caratteristiche cliniche ed anatomo-patologiche descritte, ha rappresentato e rappresenta attualmente la forma enterica più comune in tutti gli allevamenti intensivi di volatili da reddito.

Nel corso della nostra indagine è parso evidente che le tecniche di M.E., pur rispondendo in modo ottimale alle esigenze che ci eravamo prefissati in termini di rapidità di diagnosi, permettendo anche di evidenziare associazioni virali e particelle difficilmente o affatto coltivabili, in numero rappresentativo di soggetti, ci hanno posto, per contro, il limite di una incerta definizione eziologica degli agenti virali osservati. Il criterio morfolofico di identificazione, infatti, non è assolutamente sufficiente per fare diagnosi di tipo virale in considerazione dell'elevata variabilità biologica ed antigenica descritta per gruppi virali assai simili e genericamente raggruppati col termine enterovirus-like, molti dei quali risultano ancora non classificati tassonomicamente (Small Round Faecal Viruses) (Appleton, 1987). Il ritrovamento di particelle morfologicamente sovrapponibili (enterovirus-like) nelle diverse specie induce a considerare la necessità di una tipizzazione sierologica (IEM). Questa osservazione è analogamente riportabile per il genere rotavirus in cui si è evidenziata, soprattutto negli ultimi anni, la comparsa di stipiti virali non antigenicamente riferibili al gruppo A (Bridger, 1987), come emerso anche dalla nostra indagine in cui solo il 40,55% dei campioni esaminati risultava appartenere a tale sierogruppo, oltretutto con un'incidenza variabile da specie a specie.

Sebbene non vada trascurata l'importanza dell'inquadramento

tassonomico, non va dimenticato che il ruolo eziopatogenetico di rotavirus ed enterovirus-like come pure degli altri agenti a tropismo enterico deve ancora essere completamente chiarito, risultando, infatti, difficile attribuire loro, singolarmente o in associazione, la responsabilità sia di forme strettamente enteriche sia della sindrome da malassorbimento.

La natura infettiva della sindrome da malassorbimento appare indubbia ancorché condizionata da numerosi elementi di tipo ambientale, nutrizionale, genetico, manageriale, che agirebbero da fattori non solo predisponenti ma anche determinanti per la gravità dell'evoluzione clinica (Martland, 1989). Sebbene esistano altri agenti virali considerati potenziali patogeni quali, parvovirus (Kisary et al., 1984), calicivirus (Wyeth et al., 1981) e togavirus-like (Frazier et al., 1986), tuttavia, sia prove di infezione sperimentale (Decaesstecker et al., 1986), sia studi epidemiologici (Decaesstecker et al., 1988), sembrerebbero dimostrare un possibile ruolo primario degli enterovirus-like. Scarsa importanza viene, invece, attribuita in letteratura alla presenza di rotavirus (Meulemans et al., 1985; Yason Schat 1986; Decaesstecker et al., 1988): non va escluso a nostro avviso che, almeno nei casi in cui questi ultimi erano osservabili in quantità rilevante, la loro presenza possa avere contribuito ad aggravare la sindrome stessa come direttamente osservato nelle prove di campo precedentemente descritte. Inoltre il ruolo dei reovirus risulta essere piuttosto dubbio in quanto, sempre sulla base di prove di infezione sperimentale, alcuni Autori (Meulemans et al., 1980; Mc Nulty et al., 1984; Decaesstecker et al., 1986) escludono una loro responsabilità nell'eziologia nella sindrome da malassorbimento. I nostri risultati confermerebbero quanto esposto essendo mancata la comparsa della malattia in uno dei gruppi esaminati nonostante la presenza di quantità relativamente elevate di reovirus.

Si può quindi osservare che la maggiore sensibilità alle enteriti, indipendentemente dalla specie colpita, è individuabile, come per tutte le altre specie animali, uomo compreso, in soggetti giovani. Dalle prove di campo effettuate si evidenzia ancora che, laddove vengano eseguite con scrupolosità le disinfezioni albientali nel rispetto di una corretta conduzione aziendale (temperatura ambientale, aerazione, alimentazione ecc), pur assistendo ugualmente all'infezione e talvolta ad una sintomatologia clinica conclamata, i danni che da essa ne

derivano sono significativamente contenuti, con bassi indici di mortalità e rese alla macellazione conformi agli standard di specie. Per contro la pratica degli spinti programmi vaccinali, le ancora più stressanti tecnologie produttive e, non da ultime, le malattie ad effetto immunosoppressivo primario (Mandelli, 1986; Jordan, 1986) potrebbero, a nostro avviso, accentuare il manifestarsi di queste patologie.

Non possono essere trascurate le fonti di infezione che appaiono di particolare interesse anche in presenza di accurate disinfezioni in grado di limitare sicuramente l'inquinamento ambientale. L'uomo, quale veicolo passivo, le contaminazioni alla schiusa, nonché la possibile trasmissione verticale vanno a nostro avviso prese in considerazione.

Tab. 1 - Positività dei campioni esaminati al microscopio elettronico

SPECIE	CAMPIONI ESAMINATI		ALLEVAMENTI	CAMPIONI POSITIVI PER SPECIE	
	N.	% sul totale	N.	N.	% sulla specie
POLLO	287	54.15	186	154	53.7
FARAONA	99	18.65	69	67	67.7
TACCHINO	55	10.35	39	28	50.9
FAGIANO	39	7.35	30	28	71.8
STARNA	20	3.8	18	5	25.0
QUAGLIA	15	2.85	8	9	60.0
ANATRA	15	2.85	15	1	6.7
TOTALE	530	100	365	292	55.1

Tab. 2: Risultati di microscopia elettronica relativi alla specie.

SPECIE	CAMPIONI ESAMINATI N.	VIRUS ENTERO	ROTA	REO	ADENO	HERPES	PARVO	PARAMIXO	CORONA	ASSOCIAZ.	CAMPIONI POSITIVI N.
POLLO	287	71	38	5	–	1	2	10	6	21	154
FARAONA	99	37	9	–	1	–	1	3	–	16	67
TACCHINO	55	13	1	–	1	–	2	–	2	9	28
FAGIANO	39	2	18	–	1	–	–	–	–	7	28
STARNA	20	–	4	–	1	–	–	–	–	–	5
QUAGLIA	15	1	5	–	2	–	–	–	–	1	9
ANATRA	15	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1
TOTALE	530	124	75	5	6	1	6	13	8	54	292

Tab. 3 - Positività in relazione alla specie e alla famiglia virale

VIRUS	POLLO			FARAONA			TACCHINO			FAGIANO			STARNA			QUAGLIA			ANATRA			TOTALI	
	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%	$\frac{n}{N_3}$%	$\frac{n}{N_1}$%	$\frac{n}{N_2}$%
ENTERO	13.4	24.3	24.75	7.0	12.65	37.4	2.45	4.45	23.65	0.35	0.7	5.15	–	–	–	0.2	0.35	6.7	–	–	–	23.4	42.45
ROTA	7.15	13	13.25	1.7	3.1	9.1	0.2	0.35	1.8	3.4	6.15	46.15	0.75	1.35	20	0.95	1.7	33.3	–	–	–	14.15	25.65
REO	0.95	1.7	1.75	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.95	1.7
ADENO	–	–	–	0.2	0.35	1	0.2	0.35	1.8	0.2	0.35	2.55	0.2	0.35	5	0.35	0.7	13.3	–	–	–	1.15	2.1
HERPES	0.2	0.35	0.35	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	0.35
PARVO	0.35	0.7	0.7	0.2	0.35	1	0.35	0.7	3.65	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.2	0.35	66.7	1.1	2.05
PARAMIX.	1.9	3.4	3.5	0.60	1	3.0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2.5	4.4
CORONA	1.1	2.05	2.1	–	–	–	0.35	0.7	3.65	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.45	2.75
ASSOCIAZ.	4.00	7.2	7.3	3.0	5.5	16.2	1.7	3.1	16.35	1.3	2.4	17.95	–	–	–	0.35	0.35	6.7	–	–	–	10.2	18.55
TOTALI	29.05	52.7	53.7	12.70	22.95	67.7	5.25	9.6	50.9	5.25	9.6	71.8	0.95	1.7	25	1.7	3.1	60	0.2	0.35	6.7	55.1	100

n = numero campioni positivi
N_1 = numero totale campioni eseguiti
N_2 = numero totale campioni positivi
N_3 = numero totale campioni per specie

Tab. 4 - Risultati del test Elisa per rotavirus gruppo A

SPECIE	N. ESEGUITI	POSITIVI	
POLLO	49	22	(44,9 %)
FARONA	22	4	(18,2 %)
TACCHINO	6	2	(33,3 %)
FAGIANO	21	12	(57,15%)
STARNA	3	1	(33,3 %)
QUAGLIA	5	2	(40,0 %)
TOTALE	106	43	(40,55%)

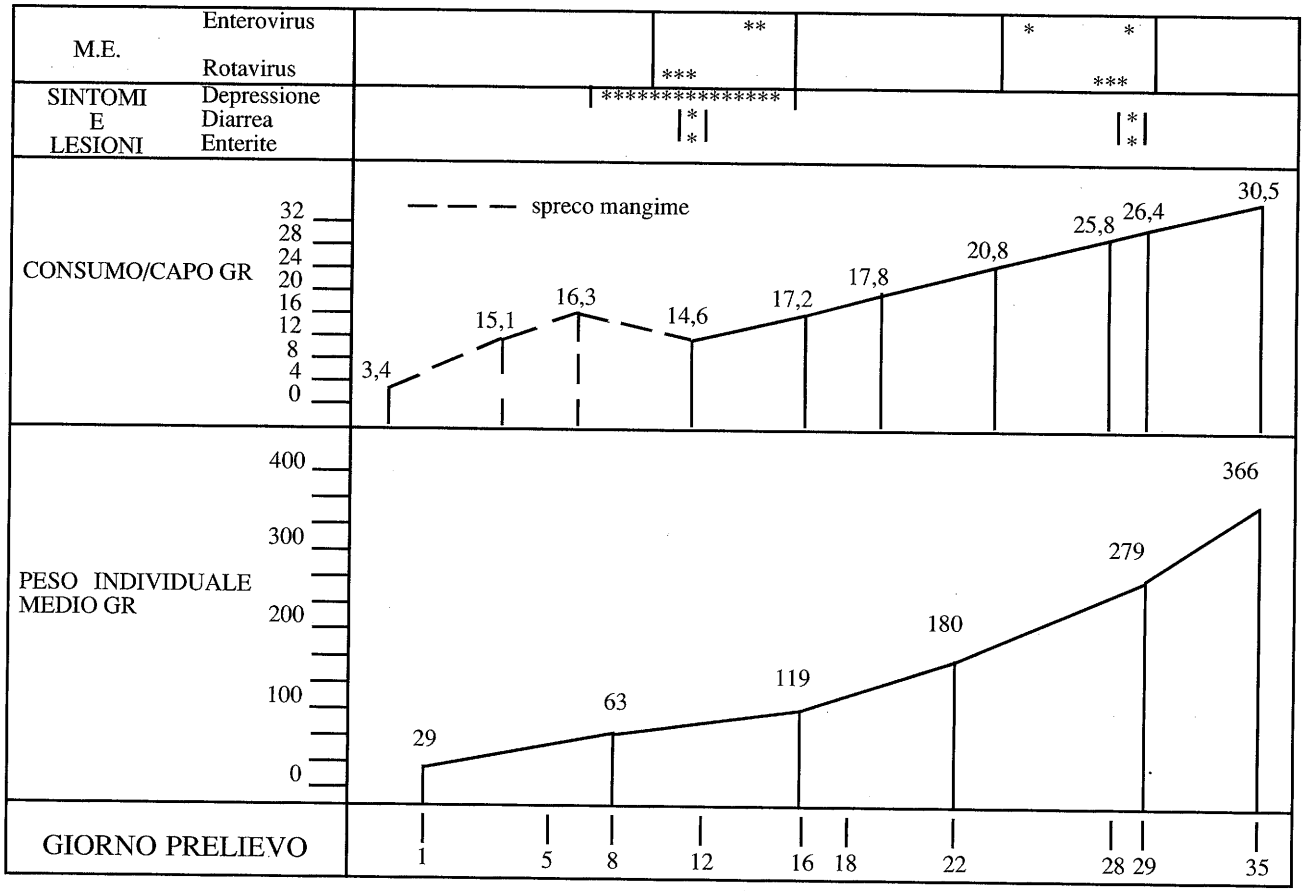
Tab. 5 - Risultati delle associazioni virali differenziati per specie

	ENTEROVIRUS-LIKE	ROTAVIRUS	CORONAVIRUS
ROTAVIRUS	10 POLLI 13 FARONE 2 TACCHINI		
CORONAVIRUS	3 FARONE 1 TACCHINO 3 FAGIANI	3 TACCHINI 1 POLLO 1 FAGIANO	
PARAMIXOVIRUS	3 POLLI	2 POLLI	2 TACCHINI
ADENOVIRUS	1 QUAGLIA	1 FAGIANO	
PARVOVIRUS	1 POLLO	1 POLLO 1 FAGIANO	
REOVIRUS	1 POLLO 1 TACCHINO	1 POLLO 1 TACCHINO	

Tab. 6 - Positività e negatività dei soggetti in relazione all'età

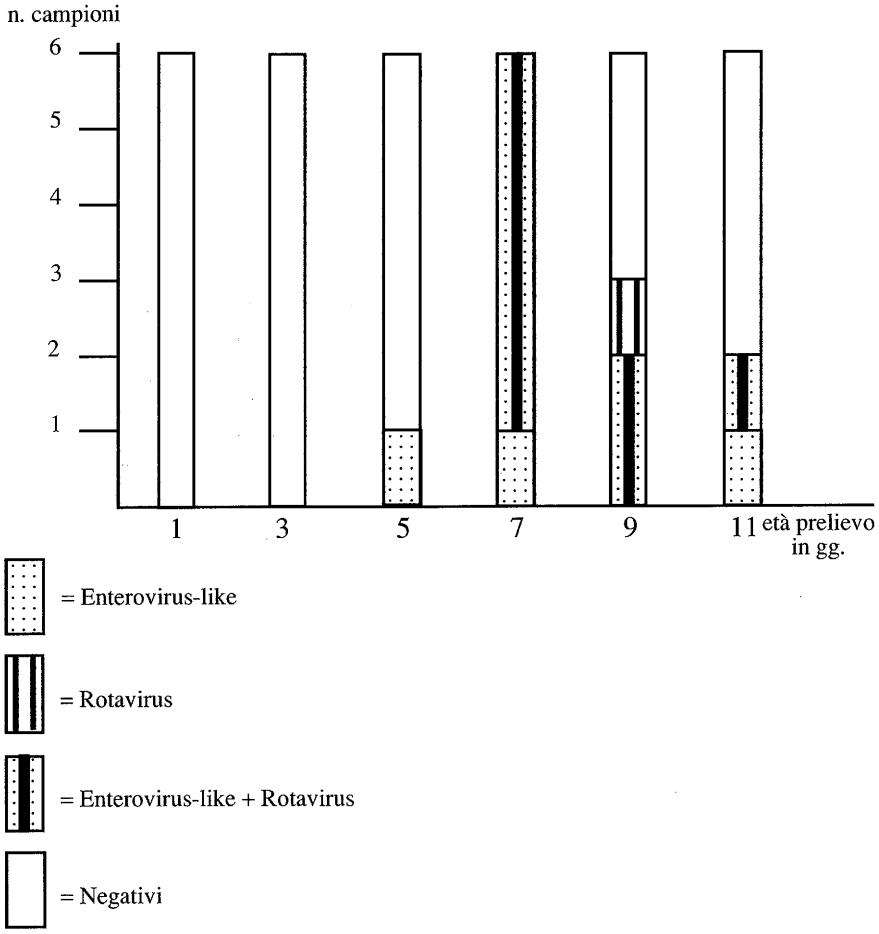
SPECIE	gg. 1-6			gg. 7-14			gg. 15-21			gg. 22-28			gg. 29-35			gg. 36-42			gg. 43-49			gg. 50->			TOT.
	N	+	–	N	+	–	N	+	–	N	+	–	N	+	–	N	+	–	N	+	–	N	+	–	
POLLO	50	28	22	107	78	29	40	26	14	11	6	5	4	0	4	3	1	2	13	2	11	35	10	25	263
FARAONA	5	2	3	13	10	3	25	21	4	17	13	4	7	6	1	2	1	1	2	1	1	0	0	0	71
TACCHINO	9	5	4	14	11	3	1	1	0	7	4	3	3	2	1	2	2	6	2	0	2	11	3	8	49
FAGIANO	11	9	2	18	13	5	6	4	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	2	0	2	39
STARNA	4	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	4	11
QUAGLIA	5	3	2	2	1	1	4	2	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15
ANATRA	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8	11
TOTALE	84	49	35	157	114	43	77	54	23	39	26	13	15	9	6	7	4	3	18	4	14	62	14	48	459

Tab. 7 - Prospetto riassuntivo dell'esperienza di campo sull'enterite della gallina faraona



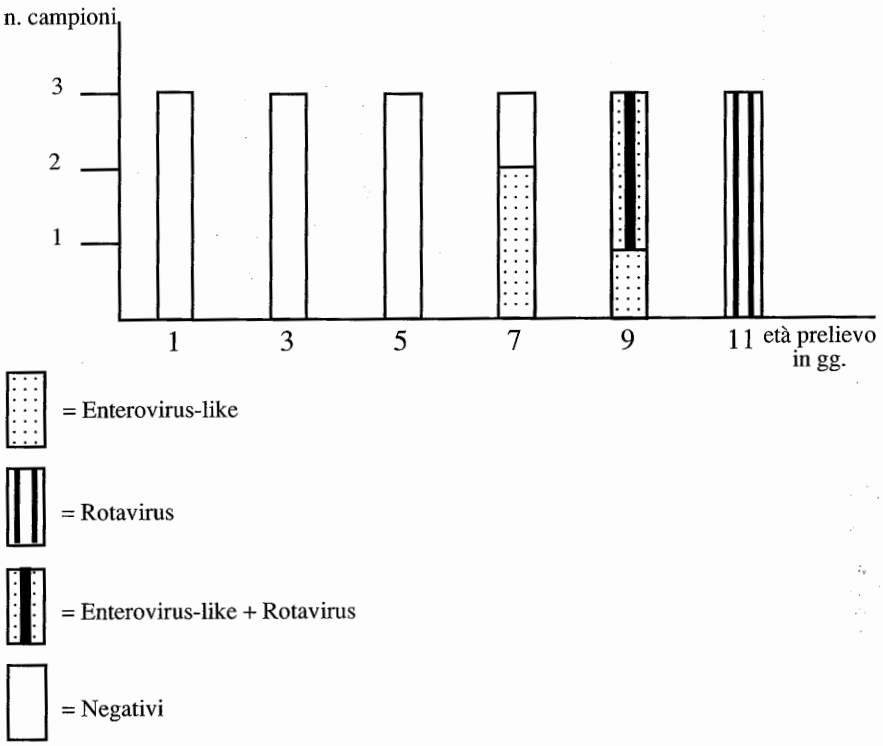
Tab. 8 - Risultati dell'esame elettronmicroscopico del gruppo A

n. particelle/mesh:	
Enterovirus-like	10-20
Rotavirus	1-5
% di scarto e mortalità a fine ciclo	7,5%



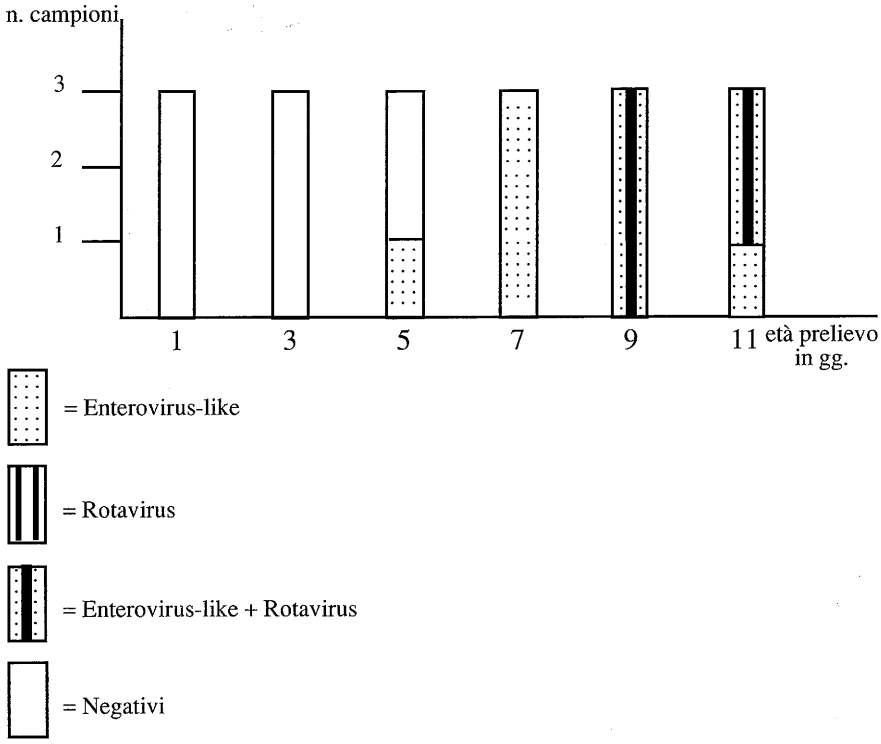
Tab. 9 - Risultati dell'esame elettronmicroscopico del gruppo B

n. particelle/mesh:	
Enterovirus-like	50-150
Rotavirus	30-150
% di scarto e mortalità a fine ciclo	11,2%



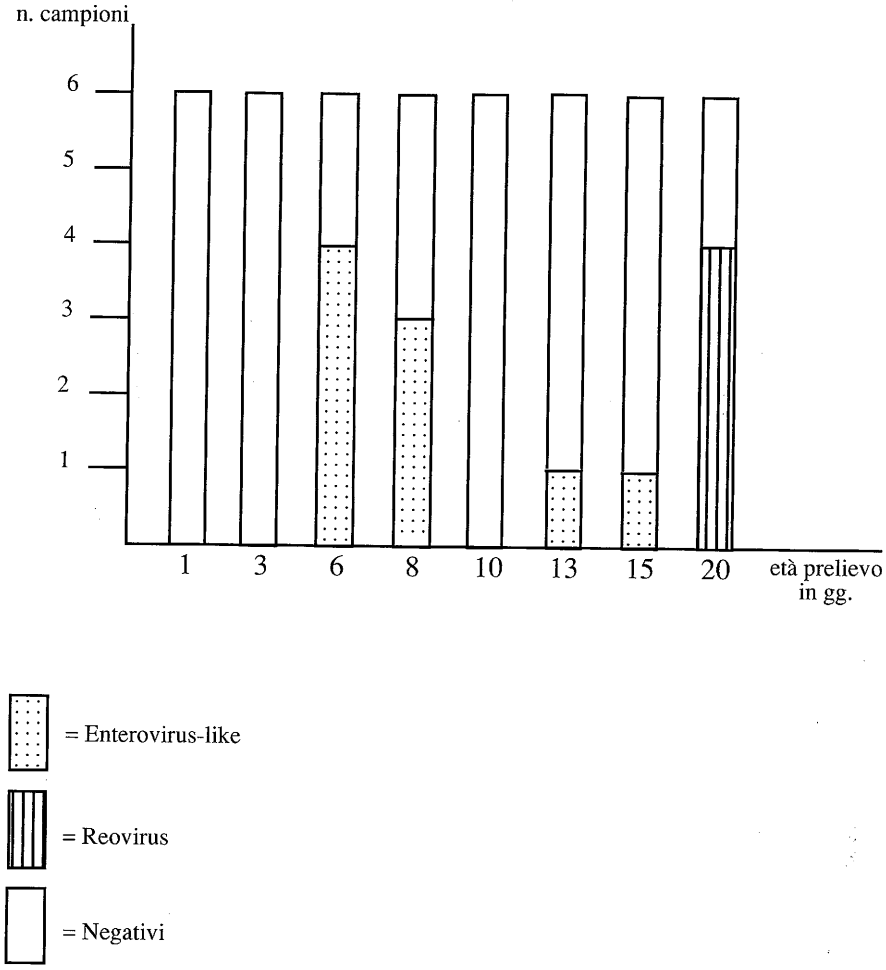
Tab. 10 - Risultati dell'esame elettronmicroscopico del gruppo C

n. particelle/mesh:	
Enterovirus-like	50-150
Rotavirus	30-150
% di scarto e mortalità a fine ciclo	16,4%



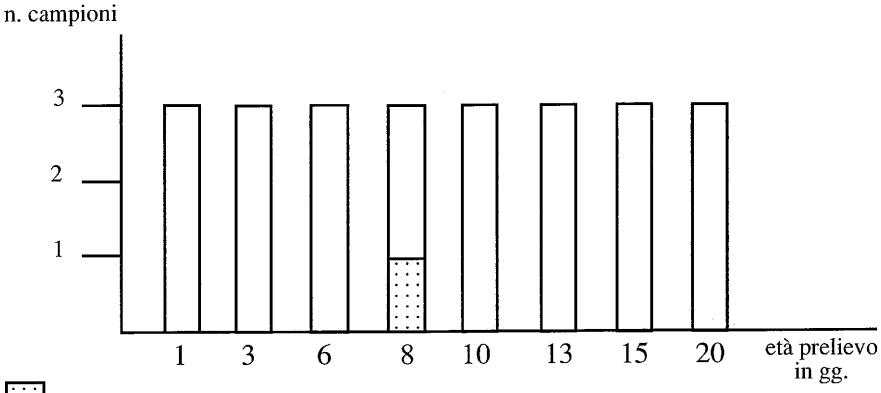
Tab. 11 - Risultati dell'esame elettronmicroscopico del gruppo D

n. particelle/mesh:	
Enterovirus-like	1-5
Rotavirus	5-20
% di scarto e mortalità a fine ciclo	4,5%



Tab. 12 - Risultati dell'esame elettronmicroscopico del gruppo E

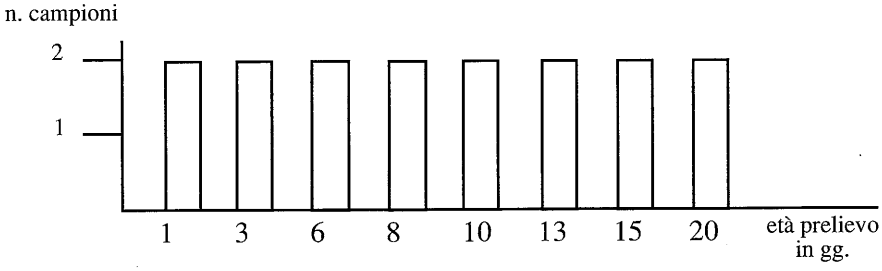
n. particelle/mesh: Enterovirus-like	30-50
% di scarto e mortalità a fine ciclo	2,1%



= Enterovirus-like

= Negativi

Tab. 13 - Risultati dell'esame elettronmicroscopico del gruppo F



= Negativi

Tab. 14 - Dati riassuntivi dei 6 gruppi di polli

Gruppi	Entero-like n. part./mesh	Rotavirus n. part/mesh	Reovirus n. part./mesh	Sintomatologia riferibile a malassorbimento	Mortalità e/o scarto a 40 gg.	Modalità disinfezione dell'allevamento
A	10-20	1-5	_·_	P	7,5%	Sali si ammonio quaternario + fumigazioni con formaldeide
B	50-150	30-150	_·_	P	11,2%	" "
C	50-150	30-150	_·_	P	16,4%	" "
D	1-5*	_·_	5-20	A	4,5%	Nebulizzazione con formalina 10%
E	30-50*◊	_·_	_·_	A	2,1%	" "
F	_·_	_·_	_·_	A	_·_	" "

* = reperto sporadico
◊ = n° di particelle riferito all'intero retino

BIBLIOGRAFIA

1) ADAMS N.R., HOFSTAD M.S., GOUCH P.M. Physical and morphological characterization of transmissible enteritis virus of turkeys. Avian Dis., *16,* 817-827 (1972).
2) ANDRAL B., TOQUIN D. Observations et isolaments de pseudopicornavirus a partir de dindonneaux malades. Avian Pathol., *13,* 377-388 (1984) a.
3) ANDRAL B., TOQUIN D. Observations au microscope electronique a partir de prelevaments de dindes presentant des troubles pathologique. Avian Pathol., *13,* 389-417 (1984) b.
4) ANDRAL B., TOQUIN D. Enterites a virus des dindonneaux en Bretagne. Point Vet., *16,* 119-125 (1984) c.
5) ANDRAL B., TOQUIN D., L'HARIDON R., JESTIN A., METZ M.H., ROES R. Les diarrhees du dindonneau: un bilan des recherches virales effectuees (rotavirus, reovirus, adenovirus, pseudopicornavirus). Avian Pathol., *14,* 147-162 (1985).
6) APPLETON H. Small Round Viruses: classification and role in food born infections. In: Novel Diarrhoea Viruses, Wiley, Chichester (CIBA Fundation Symposium), 108-125 (1987).
7) BARNES H.J. Diseases of quail. Veterinary Clinics of North America: small Animal Practice, *17,* 1109-1144 (1987).
8) BELLINZONI R., MATTION N., VALLEJOS L., LA TORRE J.L., SCODELLER E.A. Atypical rotavirus in chickens in Argentina. Research in Veterinary Science, *43,* 130-131 (1987).
9) BRUGERE-PICOUX J., SAYAD N. Environnement, stress et pathologie respiratorie chez les volailles. Une revue. Rev. Med. Vet., *138,* 423-431 (1987).
10) CERVIO G. Gli adenovirus aviari. Clin. Vet., *110,* 7-22 (1987).
11) COLLINS M.S., GOUGH R.E., PREECE B.E. Unusual virus-like particles in pheasant small intestine. Vet. Rec., *123,* 186 (1988).
12) DEA S., MARSOLAIS G., BEAUBIEN J., RUPPANNER R. Coronaviruses associated with outbreaks of transmissible enteritis of turkeys in Quebec: haemoagglutination properties and cell cultivation. Avian Diseases, *30, 319-326* (1985).
13) DECAESSTECKER M., CHARLIER G., MEULEMANS G. Significance of parvovirus, entero-like viruses and reoviruses in the etiology of the chicken

malabsorption syndrome. Avian Pathol., *15*, 769-782 (1986).
14) DECAESSTECKER M., CHARLIER G., MEULEMANS G. Epidemiological study of enteric viruses in broiler chickens: comparison of tissue colture and direct electron microscopy. Avian Pathol., *17*, 477-486 (1988).
15) FABRICANT J., CALNEK W.C. Avian Diseases. Cornell Vet., *75*, 124-129 (1985).
16) FARMER A.M., TAYLOR J. Infectious stunting syndrome: the isolation od a novel virus. Vet. Rec., *116*, 111 (1985).
17) FIELD A.M. Diagnostic virology using electron microscopic tecniques. Adv. Vir. Res., *27*, 1-55 (1982).
18) FONI E., GELMETTI D., NIGRELLI A.D., GATTI R., CARRA V. Sindrome riferibile ad enterite trasmissibile in fagiani da ripopolamento: riproduzione sperimentale della malattia - Isolamento di Rotavirus. Sel. Vet. *30*, 879-888, 1989.
19) FRAZIER J.A., FRAMER H., MARTLAND M.F. Enteric virus-like particles associated with a stunting syndrome of chickens. Vet. Rec. *118*, 303-304 (1986).
20) GALLAZZI D., ENICE F., RAMPIN T., MARCHI R., ZANELLA A., MANDELLI G. Osservazioni e ricerche su un focolaio di sindrome da malassorbimento nel broiler. Clin. Vet., *107*, 128-135 (1984a).
21) GALLAZZI D., VERGA ROSSI L., ENICE F., MANDELLI G. Ricerche istologiche sulla sindrome da malassorbimento del pollo. Clin. Vet., *107*, 176-191 (1984b).
22) GELMETTI D. Osservazioni e limiti sull'utilizzazione del microscopio elettronico nella diagnostica delle malattie del suino. Sel. Vet., *28*, 557-565 (1987).
23) GIBBS E.P.J., SMALE C.J., VOYLE C.A. Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. Vet. Rec., *106*, 451-458 (1980).
24) GIRAUD P., TOQUIN D., GUITTET M., BENNEJEAN G. Les entérites virales du dindonneau. L'aviculteur, *488*, 63-66 (1988).
25) GOODWIN M.A., DEKICH M.A., LATIMER K.S., FLETCHER O.J. Quantitation of intestinal D-Xylose absorption in normal broilers and in broilers with pale bird syndrome. avian Pathol., *29*, 630-639 (1985).
26) GOUGH R.E., ALEXANDERD.J., COLLINS M.S., LISTER S.A., COX W.J. Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. Avian Pathol., *17*, 893-907, 1988.
27) GOUGH R.E., SPACKMAN D. Virus-like particles associated with disease in Guinea fowl. Vet. Rec. *109*, 497 (1981).
28) GOVONI S., MAESTRINI M. Considerazioni sulle forme morbose dell'a-

vifauna allevata intensamente a scopo venatorio, riscontrate presso l'Istituto di Patologia aviare di Bologna, nel periodo 1/8/1976 - 31/8/1978. Clin. Vet. *102,* 309-314 (1979).

29) JORDAN F.T.W. Immunosuppressive disease in poultry. Vet. Ann., *26,* 136-145 (1986).

30) KING D.J. Comments on the etiology and immunity of transmissible (coronaviral) enteritis of turkeys (bluecomb). Am J. Vet. Res., *36,* 555-556 (1975).

31) KISARY J., NAGY B., BITAZY Z. Presence of parvovirus in the intestine of chickens showing stunting syndrome. Avian Pathol., *13,* 339-343 (1984). LI C., LIU S.X., WONG J.K., ZHIANG X.D., GU Y.L., HOU G.Y., ZHANG H. Morphological studies on animal and poultry viruses by electron microscopy. Chin. J. Vet. Med., *7,* 6-9 (1981).

32) MAESTRINI N., GOVONI S., BENASSI M.C. Patologia perinatale e neonatale della starna (*Perdix perdix*) e della pernice rossa (*Alectoris rufa*) in allevamento intensivo. Clin. Vet., *3,* 88-103 (1988).

33) MAESTRINI N., SPAGNESI M., FRANCHINI A. Su di un episodio di enterite trasmissibile nel fagiano (*Phasianus colchicus L.*). Ric. Biol. Selvag., *59,* Lab. Zool. Appl. Caccia, Bologna (1973).

34) MANDELLI G. Patologia neonatale del pollo. Riv. Avicolt., *43,* 57 (1974).

35) MANDELLI G. Infezioni aviari ad effetto immunodepressivo. Clin. Vet., *109,* 5-30 (1986).

36) MARTLAND M.F. Advances in stunting and runting syndrome research. In: Pandey R. (ed): Non oncogenic Avian Viruses. Prog. Vet. Microbiol. Immunol., Basel, Karger, vol. 5, 109-133 (1989).

37) MC FERRAN J.B., ADAIR B. Avian adenoviruses: a review. Avian Pathol., *6,* 189-217 (1977).

38) MC FERRAN J.B., MC NULTY M.S. Recent advances in enterovirus infections of birds. Pag. 195-202, in: Acute virus infections of poultry, Mc Ferran J.B. and Mc Nulty M.S. Eds., Martinus Nijhoff, Brussels (1986).

39) MC FERRAN J.B., MC NULTY M.S., MC CRACKEN R.M., GREENE J. Enteritis and associated problems. Pag. 129-138, in: Disease, prevention and control in poultry production, Hungerford T.G. Ed., University Press, Sidney (1983).

40) MC LOUGHLIN M.F., MC LOONE D.A., CONNOR T.J. Runting and stunting syndrome in turkeys. Vet. Rec., *121,* 583-586 (1987).

41) MC NULTY M.S., ALLAN G.M., CONNOR T.J., MC FERRAN J.B., MC
42) CRACKEN R.M. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. Avian Pathol., *13,* 429-439 (1984).

43) MC NULTY M.S., ALLAN G.M., MC FERRAN J.B. Isolationof a novel avian

entero-like virus. Avian Pathol., *16;* 331-337 (1987).
44) Mc Nulty M.S., Allan G.M., Stuart J.C. Rotavirus infection in avian species. Vet. Rec., *103,* 319-320 (1978).
45) Mc Nulty M.S., Allan M.G., Todd D., Mc Ferran J.B. Isolation from lacking the rotavirus group antigen. J. Gen. Vir. *55,* 405-413 (1981).
46) Mc Nulty M.S., Allan M.G., Todd D., Mc Ferran J.B., Mc Killop E.R., Collins D.S., Mc Cracken R.M. Isolation of reotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and electropherotypes. Avian Pathol., *9,* 363-375 (1980).
47) Mc Nulty M.S., Curran W.L., Mc Ferran J.B. Detection of astrovirus in turkey faeces by direct electron microscopy. Vet. Rec., *106,* 561(1980).
48) Mc Nulty M.S., Curran W.L., Tood D., Mc FerranJ.B. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. Avian Pathol., *8,* 239-247 (1979).
49) Meulemans G., Froyman R., Halen P. Epidemiologie des maladies virales des poulets de chair. 1 Les affections a reovirus. Ann. Med. Vet., *124,* 513-519 (1980).
50) Meulemans G., Peeters J.E., Halen P. Experimental infection of broilers chikens with rotavirus. British Veterinary Journal, *141,* 69-73 (1985).
51) Misciattelli M.E., Belletti G.L., Guarda F., Manstretta G., Biancardi G. Rota e coronavirus associati a diarrea neonatale dei vitelli: identificazione al microscopio elettronico con applicazioni di immunoelettromicroscopia, rilievi istopatologici e clinici. Schweiz. Arch. Tierheilk., *122,* 403-413 (1980).
52) Misciattelli M.E., Pascucci S., Giovannetti L. Sull'eziologia dell'enterite trasmissibile della gallina faraona: ricerche di microscopia elettronica nella malattia sperimentale. La Clinica Veterinaria, C104, 10-11 (1981).
53) Nersessian B.N., Goodwin M.A., Kleven S.H., Pesti D. Studies on orthoreoviruses isolated from young turkyes. I. Isolation and characterization. Avian Dis., *29,* 755-767 (1985).
54) Panigrahy B., Nagi S.A., Hall C.F. Isolation and characterization of viruses associated with transmissible enteritis (Bluecomb) of turkeys. Avian. Dis., *17,* 430-438 (1973).
55) Pascucci S., Quaglio G.L., Prati A., Maestrini N. Enterite trasmissibile nella gallina faraona. Ricerche preliminari. La Nuova Veterinaria, *46,* 258-267 (1970).
56) Pomeroy B.S., Sieburth J.M. Bluecomb of turkeys. Proc. Am. Vet. Med. Ass. Ann. Meet., 321328 (1953).
57) Pomeroy B.S. Transmissible enteritis of turkeys (blue comb). Disease

of Poultry; Hofstad M.S. (Ed.), Eight edition, Iowa State University Press, Ames, 553-558 (1984).
58) Reynolds D.L., Saif Y.M. Astrovirus: a cause of enteric disease in turkey poults. Avian Dis., *30,* 728-735 (1986).
59) Reynolds D.L., Saif Y.M., Theil K.W. a survey of enteric viruses of turckey poults. Avian Dis., *31,* 89-97 (1987) a.
60) Reynolds D.L., Saif Y.M., Theil K.W. Enteric viral infection. Avian Dis., *31,* 272-276 (1987) b.
61) Saif L.J., Siaf Y.M., Theil K.W. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. Avian Dis., *29, 798-811 (1985).*
62) Tang K.N., Fletcher O.J., Villegas P. Comparative study of the pathogenicity of Avian Reoviruses. Avian Dis., *31,* 577-583 (1987).
63) Trampel D.W., Kinden D.A., Solorzano R.F., Stogsdill P.L. Parvovirus-like enteropathy in Missouri Turkeys. Avian Dis., *27,* 49-54 (1983).
64) Tzipori S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., *29,* 103-206 (1985).
65) Wooley R.E., Dees T.A., Cromack A.S., Gratzek J.B. Infectious enteritis of turkeys: characterization of two reoviruses isolated by sucrose density gradient centrifugation from turkeys with infectious enteritis. Am. J. Vet. Res., *33,* 157-164 (1973).
66) Wyeth P.J., Chettle N.J., Labram J. Avian calicivirus. Vet. Rec., *109,* 466 (1981).
67) Yason C.V., Schat K.A. Pathohenesis of rotavirus infection in turkey poults. Avian Pathol., *15,* 421-435 (1986a).
68) Yason C.V., Schat K.A. Esperimental infection of specific pathogen free chickens with avian rotaviruses. Av. Dis., 30, 551-556 (1986b).
69) Yason C.V., Summers B.A., Schat K.A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: pathology. Am. J. Vet. Res., *48,* 927-938 (1987).
70) Yates V.J., Rhee Y.O., Fry D.E., El Mishad A.M., Mc Cormick K.J. The presence of avian adenoviruses and adeno-associated viruses in healty chickens. Avian Dis., *20,* 146-152 (1976).
71) Ziedler L., Peter W;, Heindrich R., Siebeke U., Ahrend F., Steiger A. Nachweis von Coronavirus bei Leistungsdepressionen in Broilermastbestanden. Monatsh. Veterinarmed., *39,* 371-374. (1984).

* La prova di campo è stata eseguita presso la cooperativa "La Faraona" (Montagnana PD) che qui si ringrazia sentitamente.

DISCUSSIONE

1. Interventi relativi all'argomento "Chick anemia"

Prof. Papparella

Mi sia consentito di esprimere il plauso della Società Italiana di Patologia Aviare, che qui ho l'onore di rappresentare, per questa interessante Giornata di Studio.

A prescindere dall'indubbia autorità scientifica dei Relatori, le relazioni svolte hanno messo in luce aspetti e problemi che certamente contribuiranno ulteriormente a farci ricordare questo Convegno. Ciò conferma come la patologia aviare sia in continua evoluzione, come i nostri laboratori debbano sempre più attrezzarsi per consentire l'isolamento e l'identificazione dei tanti agenti virali che continuamente insidiano la nicchia degli allevamenti intensivi.

A questo proposito vorrei anzitutto chiedere al Dr. Mc Ferran se ha la possibilità di dare ulteriori delucidazioni sulla coltivazione del C.A.A. su cellule MSB-1 e ciò al fine di conoscere meglio il tipo di effetto citopatico causato da questo agente. Secondo quesito è il seguente: ritiene, e in che misura, che questo agente possa inquinare, o aver inquinato, i vaccini vivi che adoperiamo nella prevenzione delle malattie aviarie?

Prof. Mc Ferran

Per quanto riguarda il primo quesito, non essendo personalmente coinvolto ed interessato a questo tipo di ricerca, non sono in grado di rispondere e dovrò passare la domanda ai coautori della relazione.

Circa il secondo punto, la possibilità che i vaccini siano contaminati è molto elevata, poiché sappiamo come un'alta percentuale di allevamenti S.P.F. di tutto il mondo sia stata infettata dal virus. Sappiamo inoltre che il virus si trasmette tramite l'uovo e pertanto è difficile impedirne la propagazione. Penso che in futuro il controllo dei vaccini

per un'eventuale presenza di questo virus sarà reso obbligatorio. Ritengo che il modo migliore di effettuare tale controllo sia la inoculazione del pulcino S.P.F. con successivo controllo della siero-conversione.

Dr. Lombardini

Il Prof. Papparella ha in parte anticipato la mia domanda, ma essendo questa molto importante penso di riproporla per un ulteriore approfondimento. Mi pare aver capito, dall'esposizione del Dr. Mc Ferran, che un metodo abbastanza pratico e sicuro per controllare se un vaccino già preparato sia inquinato dal virus della chick anemia sia quello di inoculare dei pulcini verificandone in un secondo tempo la sieroconversione. A questo punto vi sono due circostanze che complicano il problema: primo, non è facile avere i pulcini free che possono essere sieroconvertiti; secondo, la presenza del chick anemia virus in un vaccino potrebbe essere scoperta dopo aver prodotto grandi quantità di vaccino, quindi con conseguenti notevoli danni economici. Pertanto ci si chiede se esiste qualche metodica che permetta di ovviare a questa situazione, che è molto grave sia per il produttore che per l'utilizzatore di quell'ipotetico vaccino.

Prof. Mc Ferran

Mi rendo conto del problema. La risposta è che non esistono metodiche diagnostiche alternative alla sieroconversione. Si potrebbe ridurre il pericolo usando uova di soggetti che sono in ovodeposizione già da qualche settimana. La mia impressione è, infatti, che vi possano essere situazioni in cui soggetti apparentemente negativi si positivizzino all'inizio dell'ovodeposizione, verificandosi, a questo punto, la diffusione del virus. Se, quale produttore di vaccini, dovessi usare uova di un allevamento positivo, non le utilizzerei prima che i soggetti abbiano raggiunto le 36-38 settimane di età. Non sono sicuro che il metodo sia affidabile, ma ritengo che aumentino le possibilità di avere uova non contaminate.

Prof. Lombardi

Al di là di tutte le condanne che si stanno pronunziando nei confronti dei produttori di vaccini (i quali, oltre tutto, non hanno colpe in tal senso in quanto sono manipolatori di uova e non produttori), direi che, per quanto riguarda la purezza e la innocuità dei vaccini, bisogna tener conto dei recenti progressi che sono stati fatti nel controllo della chick anaemia. Non so se il Dr. Mc Ferran è a conoscenza che in Germania il Dr. von Bülow ha messo a punto una tecnica per il controllo di questa malattia nei riproduttori, tecnica che, dagli scambi e dalle informazioni in mio possesso, sembra dare notevoli garanzie. Attualmente il più grosso complesso produttore di uova S.P.F. in Germania applica ad un certo numero di floks queste tecniche ed è nelle condizioni di poter fornire uova esenti da C.A.A.. Queste uova sono anche in commercio, ed hanno un prezzo superiore a quello delle comuni uova S.P.F. quindi vorrei dire che già si prospetta la soluzione del problema.

Prof. Mc Ferran

Penso di avere già detto che sia in Europa che in America esistono allevamenti S.P.F. in grado di fornire uova C.A.A.-free. Mi sembra inoltre che in Germania si sia cercato di ottenere allevamenti senza infezione, esponendo i genitori al virus in modo da avere pulcini con un titolo anticorpale.

Prof. Lombardi

Volevo ulteriormente chiarire quanto ho già affermato e cioè che c'è il rischio di produrre grandi quantità di vaccino contaminato anche facendo il controllo del vaccino su animali di un giorno. Occorre avere una tecnica valida per evidenziare direttamente la presenza di un contaminante nel vaccino. È logico che il vaccino deve essere distribuito solo al termine dell'effettuazione dei controlli, criterio che viene seguito per dimostrare e verificare l'innocuità dei vaccini anche allo stato attuale.

Dr. Fabris

La domanda specifica che volevo fare riguarda i riproduttori esenti da anticorpi anti-C.A.A. Se questi riproduttori contraggono l'infezione possono trasmetterla alla progenie e successivamente, per le prime 3-4 settimane di vita, i pulcini sono immunosoppressi. In questi casi, secondo le osservazioni di autorevoli studiosi, può verificarsi una completa areattività nei confronti delle vaccinazioni anti-Marek e di conseguenza il gruppo esposto può contrarre la malattia di Marek in forma grave. Può il Dott. Mc Ferran darmi una conferma di questo?

Dr. Mc Ferran

Effettivamente esiste un effetto di accumulo fra la malattia di Marek ed altre malattie infettive. La C.A.A. è sicuramente immunosoppressiva.

Prof. Zanella

Nel settembre 1988, durante il Convegno a Hosaka sulla malattia di Marek, alcuni A.A. Giapponesi hanno riferito sulla influenza del Chick Anaemia Agent sulla incidenza della malattia di Marek solo quando i pulcini sono inoculati o esposti al virus nei primi 10 giorni di vita (pertanto tale virus avrebbe influenza solo sulle rotture precoci, cioè da mancata o insufficiente risposta immunitaria alla vaccinazione, quindi con una mortalità molto precoce per M.D.). È il Dr. Mc Ferran dello stesso parere, o non pensa che l'infezione da C.A.A. possa avere un'influenza anche sulle rotture tardive di immunità da virus della malattia di Marek?

Prof. Mc Ferran

Si tratta effettivamente di una reale possibilità. Posso solo aggiungere che noi abbiamo avuto, in Irlanda del Nord, molti casi di infezione

da C.A.A. e praticamente nessuno di malattia di Marek da ormai parecchi anni; non sembriamo pertanto avere questo problema. Tuttavia il ceppo che abbiamo avuto dagli USA si è dimostrato molto più virulento di quello inglese. Esiste infatti una marcata diversità di virulenza fra i diversi ceppi di CAA.

Dr. Sironi

Volevo chiedere al Dr. Mc Ferran se nei programmi del suo laboratorio è prevista la preparazione di DNA-probes per il C.A.A., ed ancora se non ritiene che l'utilizzazione di tecniche di dot hybridization possa essere un'alternativa alle metodiche utilizzabili per il controllo dei vaccini.

Prof. Mc Ferran

Certo, l'uso delle sonde è una reale possibilità, la sola ragione per cui io preferisco l'altra metodica è che è più economica.

Prof. Quaglio

Volevo chiedere al Dr. Mc Ferran se si hanno notizie abbastanza precise sulla percentuale di soggetti positivi sierologicamente nei gruppi infetti, cioè se tutti o solo in parte rispondono positivamente. La domanda è fatta poiché, essendo il virus trasmissibile verticalmente, mi chiedo se non vi possano essere soggetti immunotolleranti, come nel caso per es. della leucosi, il che complicherebbe ancora di più il depistage degli infetti.

Prof. Mc Ferran

Noi non abbiamo mai trovato una positività del 100% in un allevamento, ma non saprei dire se si tratta di immunotolleranza o se vi

è qualche altra ragione. Il numero dei soggetti positivi tende a decrescere con l'aumentare dell'età del gruppo. I soggetti negativi potrebbero essere all'origine di forme subcliniche. Se in un allevamento il 10% dei soggetti è privo di anticorpi, tale percentuale risulterà anche quella della progenie suscettibile, in quanto priva di anticorpi parentali.

Prof. Cessi

Non so se la mia è una battuta o può costituire un suggerimento per i produttori di vaccini: a prescindere dalla possibile trasmissione di altri virus, le uova di anatra o di tacchino potrebbero essere utilizzate per fornire vaccini vivi esenti da C.A.A.?

Prof. Mc Ferran

Il problema legato all'uso di uova di anatra o di tacchino sta proprio nel fatto che possiamo incorrere in altri virus attualmente sconosciuti e quindi avere problemi d'altro tipo.

2. Interventi relativi all'argomento "virosi enteriche" e "sindrome da malassorbimento" (MS).

Dr. Lombardini

Al prof. Pascucci vorrei chiedere quali sono i motivi che hanno impedito la realizzazione di qualche vaccino, soprattutto spento, contro la MS ed infezioni correlate.

Prof. Pascucci

Le ragioni sono principalmente due: la prima è che, nonostante siano passati molti anni, abbiamo le idee confuse sui vari agenti eziologici di queste forme e mi sembra che la relazione del Dr.

Meulemans, molto esauriente, abbia confermato queste incertezze. Secondo punto è, e lo sarà anche in futuro, che se effettivamente ci orientiamo sul ruolo preminente degli entero-like, la difficoltà maggiore risiede nell'impossibilità di coltivarli su linee cellulari o anche sull'embrione, pertanto sarà difficile moltiplicare il virus e avere abbastanza materiale antigenico per preparare vaccini spenti.

Prof. Gualandi

Mi riallaccio a quanto poc'anzi ha detto il Prof. Pascucci e nel contempo anche a quanto aveva affermato il Dr. Mc Ferran, per chiedere se non vi sia proprio alcuna possibilità di produrre vaccini del tipo sopra menzionato. Ribadisco quello che ho detto prima e cioè che, purtroppo, molti di questi virus trovano una difficoltà quasi insormontabile in sede di coltivazione e, anche quando si coltivano, nell'ottenere dei titoli sufficienti per produrre vaccini su linee cellulari.

Dr. Mc Ferran

L'attuale tendenza è di produrre vaccini di nuova generazione, per esempio del tipo ricombinante e ciò è un obiettivo di primaria importanza anche per il C.A.A. Ritengo invece che la produzione di un vaccino inattivato sia improponibile, in quanto, visto il modo in cui il virus si sviluppa, avrebbe un costo notevole.

Prof. Zanella

Più che una domanda vorrei fare un'osservazione, visto che si è parlato anche di vaccinazione. Gli entero-like, rota, astrovirus ecc. menzionati, sono agenti che colpiscono gli epiteli delle mucose superficiali, soprattutto quelle dell'apparato gastro-enterico. Pertanto i vaccini più idonei sembrerebbero essere quelli a virus vivo. Questo a differenza di quanto riscontrato per un altro enterovirus, quello della poliomielite, il quale pur avendo il suo habitat a livello intestinale, esercita il suo effetto patogeno sul sistema nervoso. Contro di esso è attivo anche un vaccino spento (vaccino Salk), non però a livello

intestinale, ma solo sul virus penetrato in circolo. Oltre all'intervento dell'immunità cellulo-mediata, contro i virus che colonizzano ed esercitano il loro potere patogeno a livello intestinale è necessario, indurre la produzione, non tanto di IgG, ma di IgA S. Ci si potrebbe arrivare con i vaccini vivi attenuati, come accennato dal Dr. Mc Ferran, ma la cosa diventa molto complicata per le notevoli difficoltà nell'ottenere un'attenuazione stabile e per la molteplicità dei virus e dei loro sierotipi.

Dr. Di Donato

In pratica, a volte, si osservano allevamenti promiscui, nei quali, cioè, si nota la contemporanea presenza di broiler e di pollastre per uova da consumo.

In caso di "sindrome da malassorbimento" il comportamento di questi soggetti è radicalmente diverso. Mentre nei polli superpesanti si evidenzia tutta la sintomatologia, e quindi arresto della crescita, alterazione del piumaggio, pallore, rachitismo, ecc., negli altri passa inosservata e si nota, al massimo, un rallentamento temporaneo dell'accrescimento. Perché questo comportamento non uniforme? Oltre alla diversità genetica, c'è un altro elemento che differenzia i vari tipi di allevamento: l'alimentazione. I broilers superpesanti vengono notoriamente allevati con mangimi grassati. Si sa che, nonostante le abituali precauzioni, spesso questi grassi vanno incontro ad una perossidazione con formazione di prodotti capaci, una volta introdotti nell'organismo, di coinvolgere nello stesso processo ossidativo i fosfolipidi delle membrane cellulari.

Si scompagina così l'architettura di tali strutture, si aumenta la loro permeabilità e, presumibilmente, si altera, il rapporto virus-cellula (accentuando, forse, il potere di penetrazione, e, quindi la capacità invasiva di questi virus). La domanda pertanto è questa: nella "sindrome da malassorbimento" può l'alimentazione costituire un fattore aggravante?

Prof. Pascucci

L'intervento di un operatore di campo è sempre molto importante perché ci da veramente la situazione di quello che avviene in pratica. Io

penso che oltre al ruolo dei virus entero-like, abbiamo anche, allo stesso tempo, sottolineato quanta importanza possa avere l'ambiente, quindi le condizioni igieniche. Mi scuso se non abbiamo citato anche il fattore alimentare. D'altra parte, in un broiler, il cui metabolismo è accentuatissimo, questi mangimi grassati devono essere metabolizzati perfettamente. È ovvio, pertanto, che si noti di più una sindrome che, determinando alterazioni del pancreas, va ad incidere su questo metabolismo. Quindi noi non dobbiamo disconoscere una certa sensibilità genetica in queste forme, e lo vediamo nella patologia di tutti i giorni e non solo per la sindrome da malassorbimento.

Prof. Reynolds

Un alimentarista con cui ho collaborato e che sta conducendo alcuni studi sulla formulazione delle reazioni in risposta alla sindrome da malassorbimento nel tacchino, ha notato un miglioramento sostituendo le proteine animali con quelle della soia. Sembra quindi che agendo sull'alimentazione si possa alleviare il decorso della malattia.

Prof. Quaglio

Io volevo aggiungere qualche cosa alla domanda che aveva fatto il Dr. Di Donato. Indubbiamente il fattore genetico è importante per l'insorgenza e lo sviluppo di molte malattie aviarie. Il fatto è che al fattore genetico è legato anche un fattore di esigenza alimentare e nelle razze leggere le esigenze alimentari sono molto minori: quindi lievi alterazioni della mucosa intestinale e del pancreas sono meno risentite da polli di razze leggere.

Prof. Gualandi

Ritorno su quanto hanno accennato poc'anzi il Dr. Di Donato ed il Prof. Quaglio circa l'importanza del fattore genetico. Abbiamo constatato, ad esempio, in una gravissima malattia, la malattia di Marek, come

determinate razze fossero abbastanza resistenti mentre altre, al contrario, fossero sensibilissime. È un discorso molto banale, ma non va dimenticato in quanto credo che in futuro si cercherà sempre maggiormente di ottenere, tramite la genetica, animali resistenti nei riguardi delle malattie. Il discorso potrebbe valere anche per la MS.

Dr. Sironi

Volevo chiedere al Prof. Meulemans chiarimenti per quanto riguarda le infezioni sperimentali da lui fatte. Ho visto che ha condotto dei tests di immunofluorescenza su vari tratti intestinali dei pulcini infettati. Ha provato qualche volta ad eseguire i tests di immunofluorescenza anche su altri organi in cui ha trovato lesioni (pancreas, reni, ecc.)?

Prof. Meulemans

No, nella nostra ricerca abbiamo focalizzato l'attenzione sui siti di moltiplicazioni dei virus, eseguendo l'immunofluorescenza a livello delle lesioni più evidenti nell'intestino. Abbiamo poi studiato la replicazione dei diversi virus entero-like a livello intestinale.

Prof. Mc Ferran

I reni risultano altamente infettati e costituiscono un'ottima "fonte" di virus, anche perché sono spesso esenti da reovirus, che costituiscono un fastidioso contaminante.

Dr. Candoli

Io volevo ritornare al discorso dell'alimentazione e della genetica. Effettivamente la genetica è importante per la MS, ma se poi gli stessi polli di razza pesante li alimentiamo con mangime tipo pollastra, questi problemi non li vediamo.

Prof. Pascucci

Volevo osservare al Dr. Candoli che con l'alimentazione da pollastra il broiler non sfrutta adeguatamente il suo patrimonio genetico e pertanto, essendo il suo metabolismo assai poco sollecitato da quel mangime, si avverte meno il deficit causato dalla maldigestione e dal malassorbimento tipici della sindrome.

Dr. Scolari

Il Prof. Pascucci ha osservato minor presenza di virus intestinali quando venivano fatte accurate disinfezioni tra un ciclo e l'altro, ed assenza degli stessi virus quando gli animali erano tenuti negli isolatori. Volevo conoscere meglio:

1) le disinfezioni effettuate in quel caso;

2) se il Dr. Meulemans avesse qualche osservazione al riguardo, cioè quali programmi di disinfezione possono funzionare meglio con questi virus.

Prof. Pascucci

Pregherei il Dr. Sironi che ha seguito le prove direttamente di precisare questi aspetti.

Dr. Sironi

Per quanto riguarda le disinfezioni, i tre gruppi della prima prova erano gruppi in cui era presente la sindrome da malassorbimento, sia come sintomi clinici, sia come lesioni anatomopatologiche. Le disinfezioni venivano fatte con sali d'ammonio quaternario previo accurato lavaggio degli ambienti. Uno o due giorni prima dell'immissione dei pulcini venivano fatte fumigazioni con paraformaldeide.

Dal momento in cui si sono cominciate ad osservare queste infezioni da enterovirus e rotavirus è stato consigliato agli allevatori di

intervenire con disinfezioni più radicali, raccomandando nel contempo al personale di prendere le precauzioni del caso: si è usata formalina in soluzione liquida al 10% per nebulizzazione e il personale utilizzava maschere che coprissero completamente il capo. Da quel momento la sindrome da malassorbimento è andata notevolmente calando. Ci sono dei dati che riguardano 190 capannoni disinfettati con ammonio quaternario, il 25% dei quali colpiti da sindrome da malassorbimento.

Successivamente i veterinari dell'allevamento hanno stabilito norme igieniche più severe (oltre alle disinfezioni con formalina si è provveduto ad aumentare il numero di cerchi ed il numero di lampade nelle pulcinaie, riuscendo a diradare il numero di pulcini durante i primi giorni di vita): tutto questo ha portato ad un diradamento della sindrome da malassorbimento per cui alla fine, sui 200 e più capannoni controllati, solamente l'1-2% è stato colpito da sindrome da malassorbimento.

Dr. Meulemans

In Belgio e in Olanda vengono prevalentemente usati due tipi di disinfettanti: il primo è formaldeide ad elevata concentrazione e il secondo è un disinfettante a base di ammonio quaternario, formaldeide e glutaraldeide. Se usati correttamente i risultati sono buoni.

Dr. Lombardini

Se mi è ancora concesso di tornare al problema delle interazioni tra alimentazione, genetica e agenti eziologici, vorrei dare un contributo molto empirico, ma che potrebbe essere illuminante. Io ho frequenti rapporti col Brasile, che ha un'avicoltura molto avanzata, grazie soprattutto alle grandi superfici di territorio che ha a disposizione: con le stesse razze di polli e con le stesse nostre formule, si ottengono indici di conversione e pesi ideali a causa della assenza degli agenti virali di cui abbiamo parlato. Quindi la componente eziologica rimane il motivo dominante alla base dei disturbi da noi lamentati.

3. Interventi relativi alle enteriti dei tacchini.

Prof. Maestrini

Il Dr. Reynolds ci ha fatto vedere una mappa delle principali aree di allevamento dei tacchini negli U.S.A. e, se ho ben capito, ci ha anche detto che in queste aree le enteriti virali incidono in modo diverso. Vorrei conoscere dal Dr. Reynolds se esistono delle ragioni per spiegare questo comportamento, quindi diversità climatiche, diverse tecniche di allevamento, ecc.

Prof. Reynolds

Dieci anni fa osservavamo negli U.S.A. un'elevata incidenza della sindrome da malassorbimento. Cinque anni fa la sindrome sembrò diminuire notevolmente nei polli. Attualmente questa sindrome è sporadica. Nei tacchini l'incidenza appare invece aumentata. Posso solo supporre che ciò sia riconducibile alle tecniche di allevamento che comportano un intenso utilizzo dei capannoni.

Il solo modo per evitare l'elevata mortalità e la diffusione dell'enterite virale consiste nello svuotare i capannoni tra un ciclo e l'altro, lasciandoli vuoti per mesi.

Prof. Pascucci

Ho accennato ad una forma di enterite tardiva del tacchino, sul secondo-terzo mese di età; l'aspetto era quello di una comune enterite, ma con mangime indigerito nelle feci, quindi con manifestazioni da riferire alla sindrome da malassorbimento. Volevo chiedere se anche negli U.S.A. si nota la sindrome da malassorbimento in tacchini di età avanzata.

Prof. Reynolds

No, noi non abbiamo isolato rotavirus nè astrovirus dopo 4-6 settimane di età. Abbiamo invece osservato molta enterite emorragica da adenovirus tipo 2 più tardivamente, cioè a 7-9 settimane di età.

Dr. Sironi

Volevo chiedere al Dr. Reynolds qualche chiarimento a proposito delle infezioni da rotavirus nei fagiani. Mi risulta che recentemente sono state riportate segnalazioni, specie per quanto riguarda i mammiferi, di infezioni da rotavirus-like non classificati, in cui le alterazioni istologiche più caratteristiche a livello intestinale erano i sincizi epiteliali. Non ha mai osservato reperti di questo genere nell'epitelio intestinale da rotavirus nei fagiani?

Prof. Reynolds

No, ma si tratta di ricerche molto recenti e quindi non escludo tale possibilità. Vorrei inoltre sottolineare che si tratta di rotavirus del gruppo D, segnalati soltanto nelle specie aviarie. Quelli a cui lei sta riferendosi appartengono ad altri gruppi di rotavirus dei mammiferi? Col rotavirus A non abbiamo osservato nel pollo le alterazioni cui lei si riferisce.

Finito di stampare
da La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia
nel novembre 1989