ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:

INFEZIONI RESPIRATORIE DEL BOVINO

BRESCIA - 25 SETTEMBRE 1979

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU INFEZIONI RESPIRATORIE DEL BOVINO

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA
Brescia - Via Bianchi 7

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU:

INFEZIONI RESPIRATORIE DEL BOVINO

Brescia: 25 settembre 1979

Edito a cura della
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - maggio '80

Stampa: La Nuova Cartografica - Brescia

INDICE

PRESENTAZIONE . . . . . pag. VII

LA SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA ED I CORSI ANNUALI DI ZOOPROFILASSI . . . . . » IX

RELATORI . . . . . » 3

SCATOZZA F. - Presentazione e definizione del tema . . . » 5

SCATOZZA F. - Le infezioni da virus ed il loro possibile significato come causa di malattia respiratoria nel bovino . . » 13

BAGLIONI T. - Natura e ruolo di alcuni dei fattori predisponenti l'insorgenza di malattia respiratoria nel bovino . . . » 24

BALLARINI G. - Problemi di diagnosi clinica nelle sindromi respiratorie dei bovini in allevamento intensivo . . . . » 36

VALENZA F. e GUARDA F. - Recenti acquisizioni sull'anatomia patologica delle principali malattie respiratorie del bovino » 55

CASTRUCCI G. - L'impiego delle colture cellulari nella diagnosi delle infezioni respiratorie del bovino ad eziologia virale » 72

FLAMMINI C.F., BOTTARELLI E., ALLEGRI G., DE SIMONE F. e CIVARDI A. - Ricerca di antigeni virali mediante immunofluorescenza . . . . . » 84

MAGLIONE E. - Sierodiagnostica nelle infezioni da virus respiratorio sinciziale dei bovini . . . . . » 103

SIDOLI L. e BARIGAZZI G. - Accertamento ed identificazione della flora di complicazione in corso di sindrome respiratoria dei bovini . . . . . » 113

ROSSI C. - Criteri di selezione dei vaccini contro le infezioni respiratorie del bovino e relativo impiego . . . . » 129

CARLOTTO F. - Principi e metodiche del pre-condizionamento dei bovini da carne . . . . . » 135

BELLANI L. - Infezione respiratoria dei bovini. Norme di Polizia Veterinaria . . . . . » 140

DISCUSSIONE . . . . . » 145

PRESENTAZIONE

La Giornata di studio sulle «Malattie respiratorie del bovino» si è tenuta nell'ambito del Corso annuale di Zooprofilassi, organizzato dalla Scuola per la Ricerca Scientifica.

Alla Giornata di studio hanno partecipato docenti italiani di diversa specializzazione, provenienti dal Ministero della Sanità, dalle Unversità, dagli Istituti Zooprofilattici, dai Servizi Veterinari Regionali, dalla pratica e gli allievi del Corso di Zooprofilassi.

I presenti Atti sono pubblicati a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia e messi a disposizione delle categorie interessate al fine di fornire un aggiornamento su un problema di attualità ed importanza pratica quale quello della patologia respiratoria del bovino.

Per conoscenza, si premettono alcune note illustrative della Scuola per la Ricerca Scientifica di Brescia e dei Corsi annuali di Zooprofilassi.

Brescia, 31 marzo 1980

IL PRESIDENTE
(Dr. Pierjacomo Ghitti)

IL SEGRETARIO GENERALE
(Dr. Angelo Pecorelli)

LA SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA ED I CORSI ANNUALI DI ZOOPROFILASSI

La Scuola per la Ricerca Scientifica è stata realizzata sulla base di *un'intesa fra l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche.* L'apposita convenzione è stata stipulata il 19 febbraio 1976.

La Scuola ha sede in Brescia, via Bianchi 1, in fabbricati di proprietà dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia.

Gli scopi che si intendono perseguire si riferiscono *alla ricerca scientifica con programmi finalizzati per la qualificazione tecnologica e professionale nei settori della veterinaria e della zootecnia a tutti i livelli operativi al fine dello sviluppo scientifico, culturale, professionale e sociale in campo nazionale ed estero.*

L'attività della Scuola per la Ricerca Scientifica in questi primi anni ha coinciso praticamente con l'organizzazione dei Corsi annuali di Zooprofilassi.

Sono in studio per una prossima realizzazione altre iniziative di cui sarà data notizia a tempo debito.

I Corsi annuali di Zooprofilassi si propongono essenzialmente la seguente finalità:

— *completare ed approfondire in senso pratico-applicativo le conoscenze prevalentemente teoriche dei giovani laureati nel campo delle tecniche di laboratorio, della batteriologia, della micologia, della virologia, della parassitologia e di dare contemporaneamente a queste conoscenze un indirizzo verso l'applicazione nel campo della zooprofilassi.*

In pratica essi vogliono fornire una preparazione di base per i giovani laureati che intendono esplicare le loro attività negli Istituti Zooprofilattici, nei Servizi Veterinari Pubblici, nel settore Igienico Veterinario dell'Industria della trasformazione degli alimenti di origine animale e dei mangimifici, nonché negli allevamenti intensivi degli animali da reddito.

Tutto questo non in contrapposizione con le Università ma in collaborazione stretta con esse come pure con altri Enti Pubblici o privati.

Le modalità di realizzazione di questa formazione sono:

1. *Insegnamento ad operare in modo autonomo*

A questo fine alle strutture previste dalla Scuola è stata data priorità alle strutture di laboratorio dimensionate in misura tale da permettere ad ogni allievo di lavorare in modo autonomo sotto la vigilanza continua di Docenti a tempo pieno.

2. *Ampliamento degli orizzonti culturali e di aggiornamento*

A questo fine le lezioni vengono tenute non solo da Docenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia ma anche da Docenti provenienti da varie Facoltà di Veterinaria e di Medicina italiane e straniere, da altri Istituti Zooprofilattici, dall'Istituto Superiore di Sanità, dai Servizi Veterinari Statali, Regionali ed Internazionali.

Giornate di studio monografiche interdisciplinari completano l'insegnamento. Ad esse vengono invitati Docenti di varia specializzazione, che presentano relazioni e partecipano alla discussione.

3. *Apprendimento della lingua inglese*

Al fine di permettere una consultazione facile della maggior parte della letteratura tecnica internazionale che, com'è noto, è scritta per circa l'80% in lingua inglese, viene impartito un corso intensivo in questa lingua.

4. *Affinamento delle capacità di sintesi e di esposizione al pubblico*

Fra le attività dei tecnici laureati si devono annoverare non solo quelle all'interno dei laboratori o nella pura e semplice esplicazione di attività tecniche applicative, ma si deve auspicare in misura crescente anche quella di contribuire all'aggiornamento tecnico degli allevatori e dei tecnici operanti ai diversi livelli nei vari settori in cui la zooprofilassi ha importanza.

A questo fine durante lo svolgimento dei corsi i singoli allievi sono invitati a presentare relazioni su determinati argomenti ed a partecipare alle discussioni che ne seguono.

Le relazioni vengono presentate in pubblico alla presenza non solo dei Docenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, ma anche di Docenti della Facoltà Veterinaria, di altri Istituti Zooprofilattici e dei Servizi Veterinari Regionali.

5. Esame finale

È articolato su 2 giorni di prove pratiche eseguite individualmente dagli allievi e sulla presentazione di una relazione esposta come conferenza non letta, della durata di 30-40 minuti, su un argomento di attualità e sulla relativa discussione pubblica.

La Commissione giudicatrice è composta da un rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità, da un Professore di ruolo di una Facoltà Veterinaria, da un rappresentante dei Servizi Veterinari dell'Assessorato alla Sanità della Regione Lombardia, dal Direttore dell'Istituto Zooprofilattico, dal Direttore e dal Consulente Scientifico della Scuola per la Ricerca Scientifica.

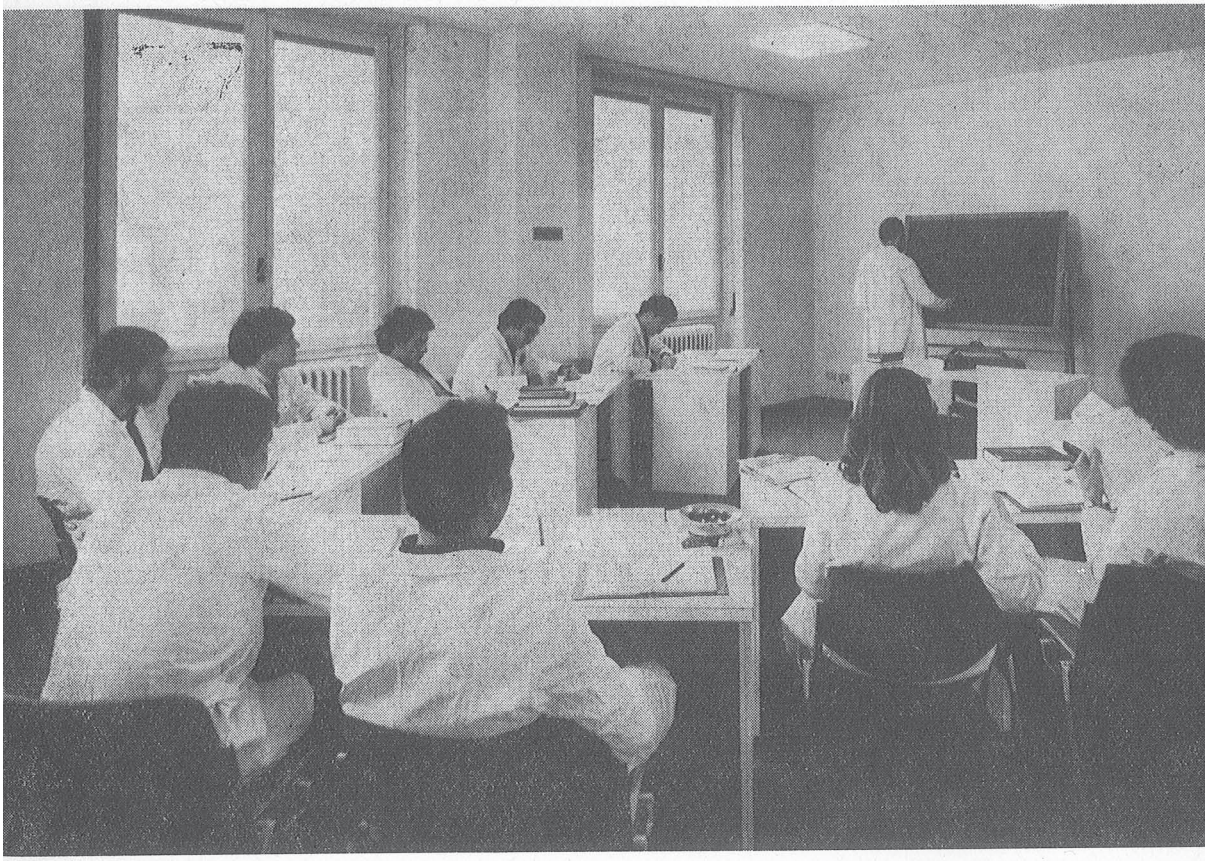
Al fine di dare un'idea sull'articolazione dei Corsi di Zooprofilassi, riportiamo i seguenti dati che si riferiscono al Corso di Zooprofilassi 1979-1980, in via di svolgimento.

Durata del Corso, settimane	44
Giorni lavorativi per settimana	5
Ore settimanali	30
Ore giornaliere	6
Lezioni teoriche, ore	300
Esercitazioni pratiche, ore	500
Studio guidato, visite in allevamento, preparazione e presentazione relazioni, ore	350
Lingua inglese, ore	150
Totale per anno, ore	1.300

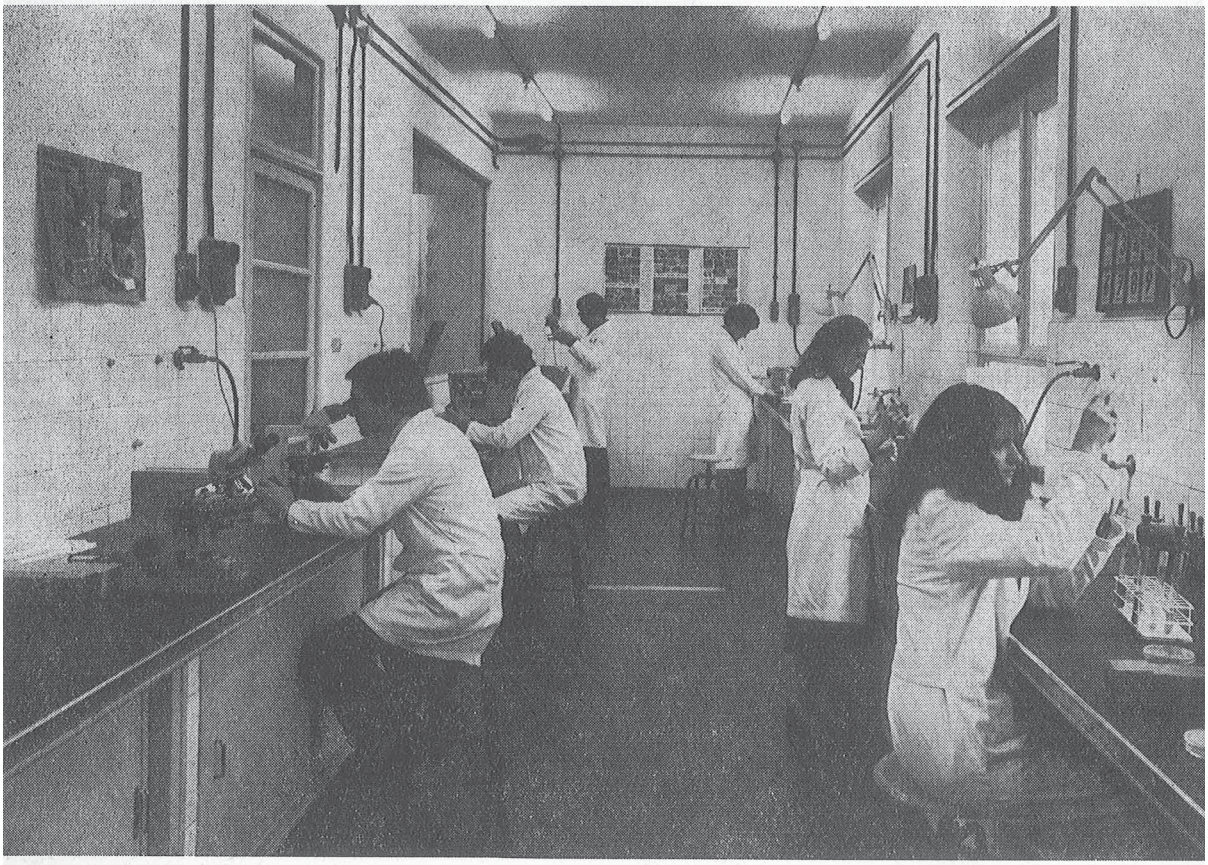
L'ammissione alla Scuola è «a numero chiuso» ed è riservata a laureati in Medicina Veterinaria ed in Scienze Biologiche. Ogni anno la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, assegnano

un certo numero di borse di studio. È obbligatoria la frequenza a tempo pieno.

La responsabilità e la conduzione della Scuola sono state assunte dal Prof. Lino Nardelli (docente-consulente scientifico) e dal Prof. Gianfranco Panina (docente-direttore della Scuola).



Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia - Un'aula di lezione



Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia - Un laboratorio per le esercitazioni di gruppo

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO SU INFEZIONI RESPIRATORIE DEL BOVINO

RELATORI

Prof. T. BAGLIONI
Istituto di Patologia Generale Veterinaria. Milano.

Prof. G. BALLARINI
Istituto di Clinica Medica Veterinaria. Parma.

Prof. L. BELLANI
Direttore Generale dei Servizi Veterinari del Ministero della Sanità. Roma.

Prof. F. CARLOTTO
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Padova.

Prof. G. CASTRUCCI
Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria. Perugia.

Prof. C. F. FLAMMINI
Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria. Parma.

Prof. F. GUARDA
Istituto di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria. Torino.

Prof. E. MAGLIONE
Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria. Torino.

Prof. C. ROSSI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte e della Liguria. Torino.

Prof. F. SCATOZZA
Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria. Parma.

Dott. L. SIDOLI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia. Sezione di Parma.

F. SCATOZZA (*coordinatore*)

PRESENTAZIONE E DEFINIZIONE DEL TEMA

Questa Giornata di Studio, organizzata nel quadro delle attività della Scuola per la Ricerca Scientifica, ha il duplice scopo di offrire agli allievi un aggiornamento su un tema di viva attualità e di promuovere un incontro tecnico fra esperti e studiosi di patologia bovina.

Ai Relatori, che ringrazio fin d'ora anche a nome di tutti presenti, è affidato il compito di esporre, in chiave analitica, i risultati delle proprie esperienze sui diversi temi nei quali l'argomento generale è stato articolato. La discussione che prevedo vivace ed esauriente, dovrà concorrere non soltanto a chiarire eventuali punti rimasti in ombra ma anche ad ottenere una visione di sintesi degli argomenti esposti in tono settoriale e specialistico.

Prima di dare inizio ai lavori, desidero esprimere la mia personale riconoscenza alla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche ed all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia che, attraverso l'appassionata opera del Prof. Nardelli, hanno reso possibile questa manifestazione.

* * *

Per la complessità che lo caratterizza, il tema che ci accingiamo a trattare non è facilmente definibile. Ciò in gran parte deriva dal fatto che, nonostante le cospicue acquisizioni di ordine scientifico, le sindromi respiratorie del bovino appaiono tuttora non classificate sul piano eziologico ed inoltre non risultano precisati i meccanismi patogenetici che ne determinano l'insorgenza.

Da un punto di vista microbiologico è nota l'esistenza di una lunga lista di agenti capaci di determinare infezione dell'apparato re-

spiratorio nel bovino ma è anche noto che la loro presenza non sempre costituisce la premessa per l'insorgenza di malattia conclamata. Essi infatti si repertano con elevata frequenza sia fra animali clinicamente sani che in corso di sindromi respiratorie a carattere contagioso, il che impedisce di istituire una correlazione del tipo causa-effetto quale si ricava dall'applicazione dei postulati di Koch.

Peraltro, se è certo che a tali microorganismi spetta la qualificazione di «patogeni respiratori», è anche evidente che essi hanno acquisito importanza sul piano della patologia solo in presenza delle trasformazioni tecnologiche che si sono verificate nell'allevamento del bovino. In altri termini, l'avvento delle nuove tecnologie ha coinciso con la comparsa di una patologia che deve essere considerata nuova solo perché si manifesta in forme poco note rispetto al passato.

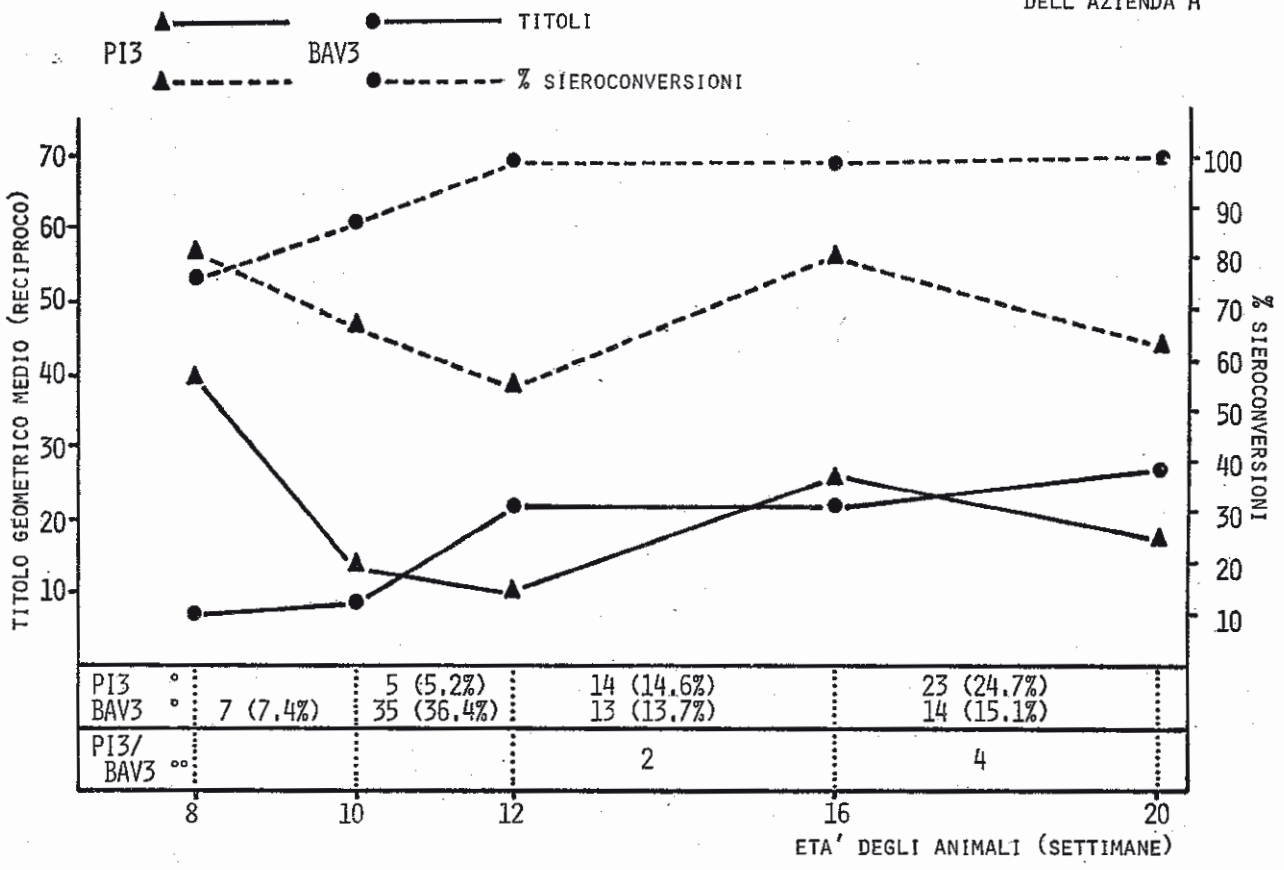
In che modo i due elementi ora cennati interagiscono rimane ancora e per gran parte da chiarire. Poche cose infatti sono attualmente note con certezza e fra esse non va dimenticato che l'allevamento intensivo del bovino costringe all'assembramento di animali di provenienza diversa con la conseguente circolazione di microorganismi, patogeni e non, anche per lunghe distanze. Peraltro, la loro disseminazione all'interno dei singoli gruppi è favorita per gli ambienti circoscritti e determina un conseguente incremento delle relative infezioni. È infine possibile che il passaggio rapido di microorganismi poco patogeni nell'ospite naturale ne determini la virulentazione e quindi la capacità ad indurre infezione e/o malattia.

Il credito che può essere attribuito a queste poche considerazioni di ordine infettivistico non è però sufficiente a giustificare il notevole incremento di frequenza delle sindromi respiratorie nell'allevamento bovino ed il conseguente danno economico che ne deriva. È certo che, agli elementi negativi già menzionati, l'allevamento intensivo ne aggiunge altri che gli sono propri. Ci si può riferire agli effetti genericamente sfavorevoli che si determinano a seguito della formazione dei gruppi, del trasporto, delle modificazioni di ambiente e di regime alimentare, che certamente riducono la capacità reattiva degli animali nei confronti delle infezioni. Resta tuttavia da definire l'entità del danno che essi subiscono nonché le modalità attraverso le quali tale danno favorisce l'impianto e l'evoluzione dei patogeni respiratori.

Tutto depone quindi a favore dell'ipotesi secondo la quale malattia respiratoria insorge per azione combinata di agenti causali numerosi e di varia natura; alcuni di essi sono stati chiaramente individuati ma la loro lista è ben lontana dal completamento. Poco invece si conosce riguardo alle modalità attraverso le quali essi agiscono, ai meccanismi di difesa che il bovino è in grado di approntare, alla successione degli eventi che da uno stato di infezione pressoché asintomatica conducono alla comparsa di malattia manifesta.

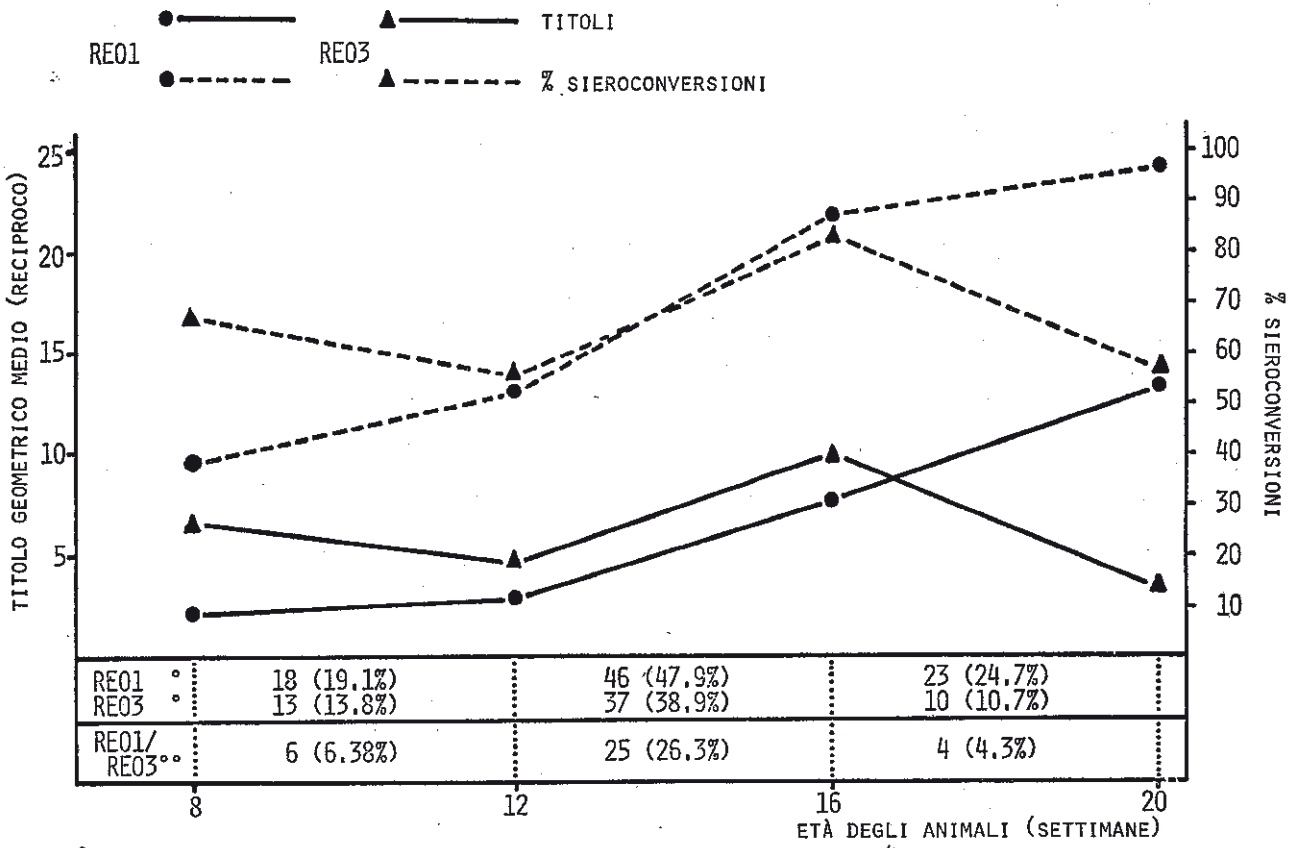
Scopo di questa giornata di studio è perciò di puntualizzare le acquisizioni finora note e di confrontare la posizione dei singoli specialisti nei diversi settori nei quali l'argomento è stato articolato. Non so se ed a quanti dei problemi ancora aperti potrà essere fornita una risposta, sono tuttavia certo che il lavoro di oggi sarà per ognuno di noi motivo di arricchimento intellettuale oltre che spunto per una ulteriore e proficua attività di ricerca e sperimentazione.

GRAFICO 1. COMPORTAMENTO DELLA SIEROCONVERSIONE NEI CONFRONTI DEI VIRUS PI3 E BAV3 FRA GLI ANIMALI DELL'AZIENDA A



° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE FRA DUE PRELIEVI CONSECUTIVI.
°° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE NEI CONFRONTI DI PIÙ VIRUS.

GRAFICO 2. COMPORTAMENTO DELLA SIEROCONVERSIONE NEI CONFRONTI DEI VIRUS REO1 E REO3 FRA GLI ANIMALI DELL'AZIENDA A.

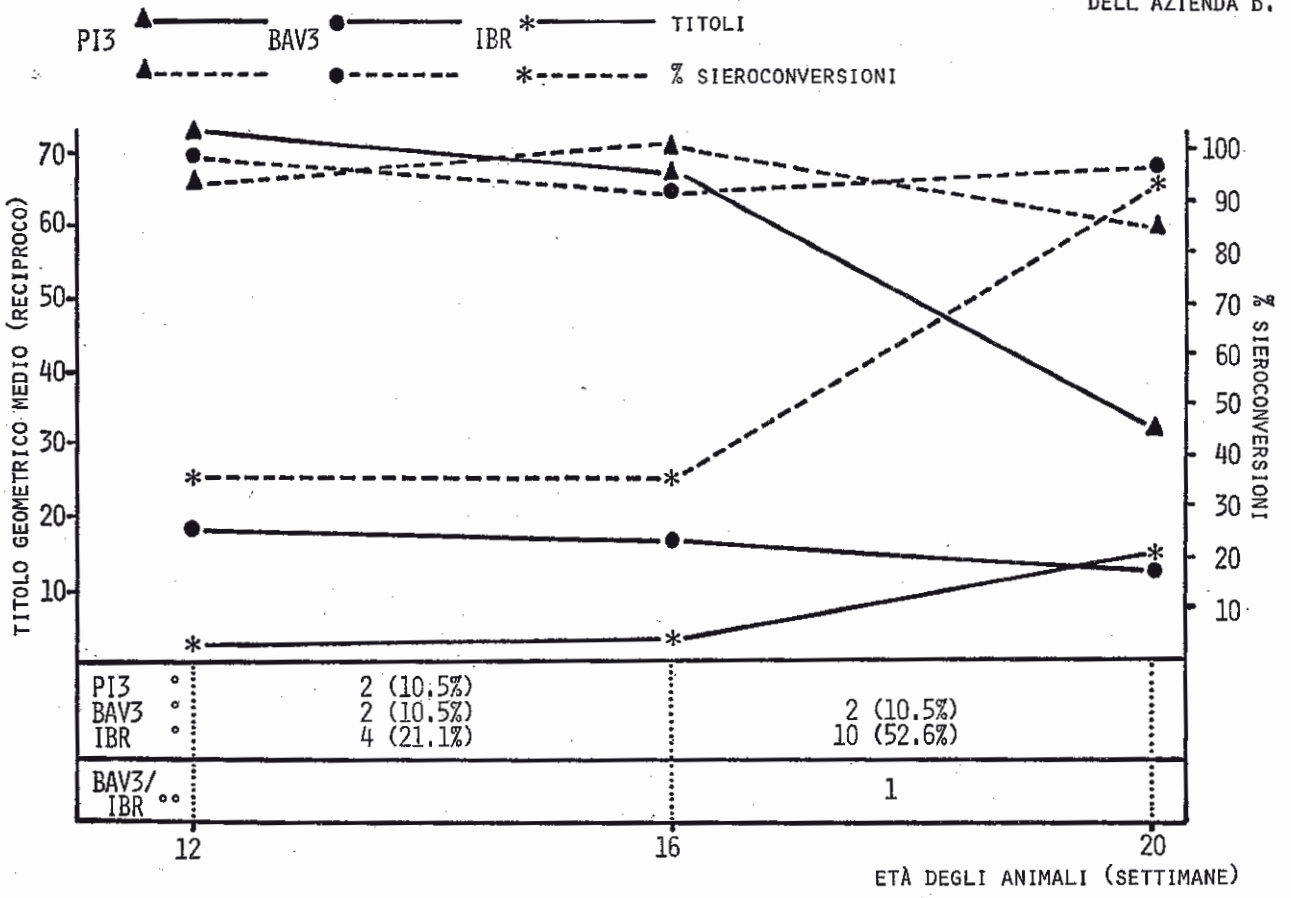


	8	12	16	20
REO1 °	18 (19.1%)	46 (47.9%)	23 (24.7%)	
REO3 °	13 (13.8%)	37 (38.9%)	10 (10.7%)	
REO1/ REO3°°	6 (6.38%)	25 (26.3%)	4 (4.3%)	

° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE FRA DUE PRELIEVI CONSECUTIVI.

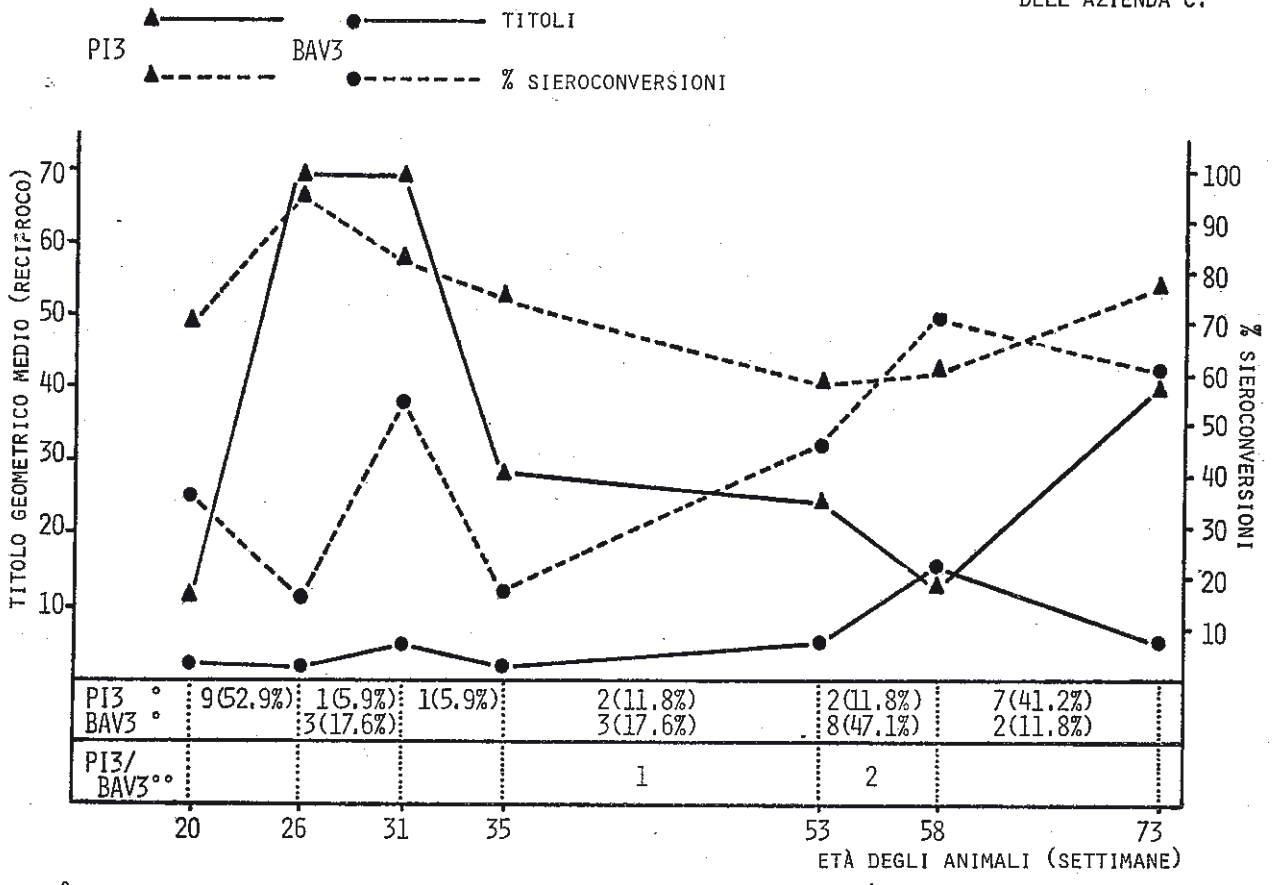
°° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE NEI CONFRONTI DI PIÙ VIRUS.

GRAFICO 3. COMPORTAMENTO DELLA SIEROCONVERSIONE NEI CONFRONTI DEI VIRUS PI3, BAV3 E IBR FRA GLI ANIMALI DELL'AZIENDA B.



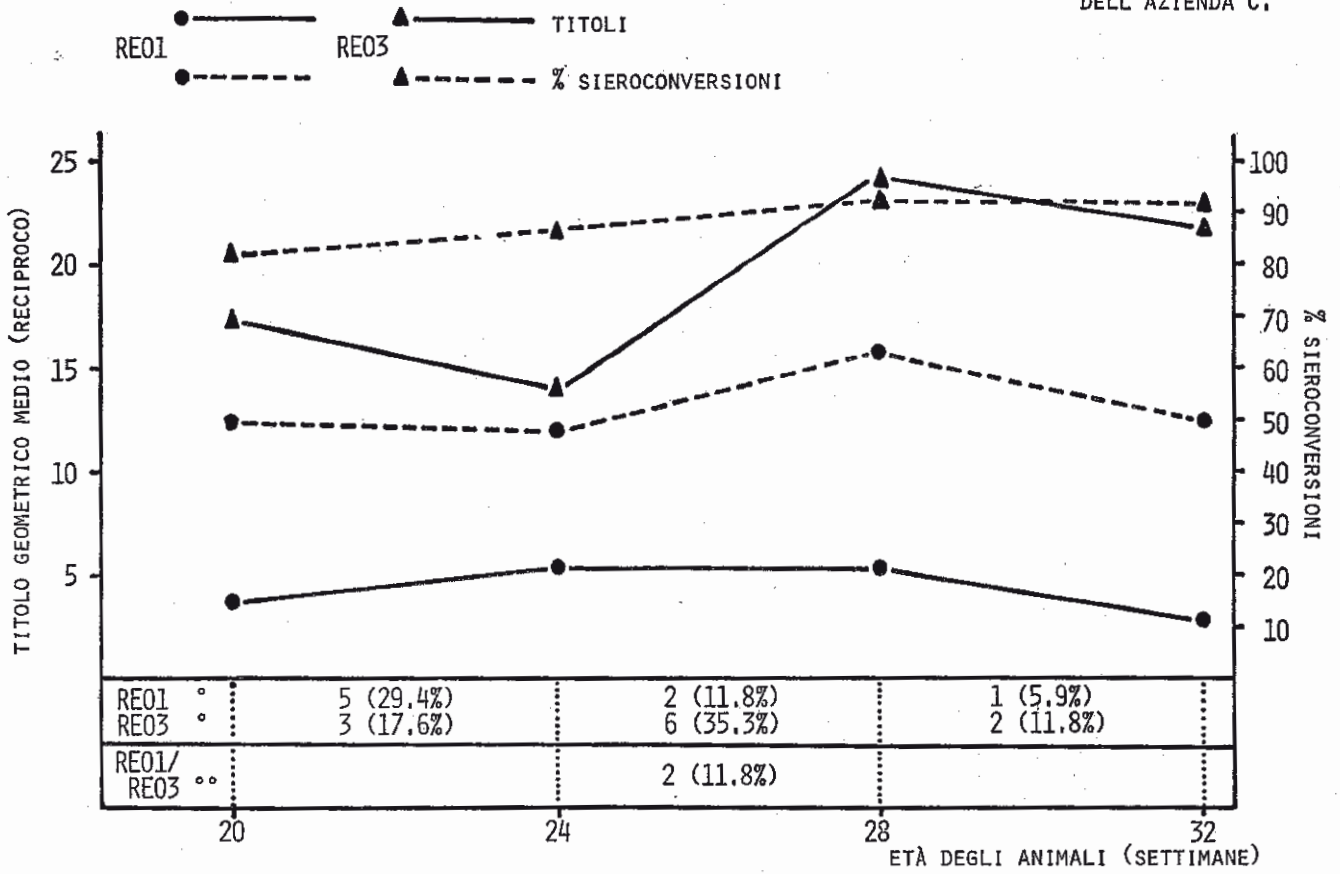
° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE FRA DUE PRELIEVI CONSECUTIVI.
°° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE NEI CONFRONTI DI PIÙ VIRUS.

GRAFICO 4. COMPORTAMENTO DELLA SIEROCONVERSIONE NEI CONFRONTI DEI VIRUS PI3 E BAV3 FRA GLI ANIMALI DELL'AZIENDA C.



° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE FRA DUE PRELIEVI CONSECUTIVI.
°° : SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE NEI CONFRONTI DI PIÙ VIRUS.

GRAFICO 5. COMPORTAMENTO DELLA SIEROCONVERSIONE NEI CONFRONTI DEI VIRUS REO1 E REO3 FRA GLI ANIMALI DELL'AZIENDA C.



° :SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE FRA DUE PRELIEVI CONSECUTIVI.
°° ; SIERI CHE HANNO MOSTRATO UN INCREMENTO DI TITOLO DI ALMENO 4 VOLTE NEI CONFRONTI DI PIÙ VIRUS.

F. SCATOZZA

LE INFEZIONI DA VIRUS ED IL LORO POSSIBILE SIGNIFICATO COME CAUSA DI MALATTIA RESPIRATORIA NEL BOVINO

Nel quadro delle malattie respiratorie del bovino, quali esse si presentano nella pratica corrente, è facile individuare l'esempio tipico di una patologia che evolve di pari passo con l'introduzione di particolari metodiche o tecnologie di allevamento. Il termine di «patologia condizionata» trova appunto giustificazione nel fatto che essa predomina in condizioni particolari individuabili nell'ambiente, genericamente inteso, nel quale gli animali vengono mantenuti.

In tale contesto, compito dell'infettivista è di individuare la componente microbica che può essere chiamata in causa nel determinismo di tale patologia ed il relativo meccanismo di azione. All'assolvimento di tale compito ostano almeno due difficoltà sostanziali riguardanti, da un lato, la dimostrazione di una effettiva attitudine patogena dei microorganismi eventualmente repertati nell'apparato respiratorio e, dall'altro, il riscontro nello stesso animale di più agenti da ritenere patogeni.

La prima difficoltà è legata al fatto che, in base ai postulati di Koch, la qualifica di patogeno spetta a quei microorganismi che si dimostrano capaci di provocare malattia nell'ospite anche dopo infezione sperimentale mentre, nel caso specifico di batteri e virus ritenuti responsabili di malattia respiratoria nel bovino, tale dimostrazione è difficilmente ottenibile. D'altra parte, il possibile reperto di più patogeni nello stesso individuo fa ritenere che la comparsa di segni di malattia sia legata ad un sinergismo d'azione oppure ad una successione di effetti sfavorevoli sull'animale.

Per quanto attiene ai diversi virus che interessano in tema di patologia respiratoria del bovino, è opportuno a questo punto sottolineare che essi acquisiscono la qualifica di patogeno quando risultano capaci di riprodurre uno stato d'infezione nell'ospite naturale sen-

ze che questa necessariamente determini malattia clinicamente manifesta. A dimostrare l'esistenza di tale stato d'infezione vengono di norma utilizzati due parametri riguardanti, rispettivamente, l'escrezione del virus attraverso le vie respiratorie dopo infezione sperimentale e la reazione immunitaria che questa determina nell'ospite.

Da ciò deriva che la dimostrazione della presenza di anticorpi nel siero di sangue (siero-conversione) è in grado di fornire la prova della circolazione di un determinato virus all'interno di una popolazione animale. La riprova di ciò sta anche nel fatto che, sia pure con i dovuti accorgimenti, l'indagine sierologica può essere utilizzata ai fini della diagnosi eziologica delle virosi respiratorie.

Quanto alle applicazioni delle conoscenze ora citate, esse riguardano due settori abbastanza definiti. Il primo si riferisce alle inchieste di epidemiologia sierologica, generalmente svolte per campione su individui sani e viventi entro aree relativamente ampie. Tali inchieste consentono, attraverso la rilevazione di siero-conversione, di valutare l'incidenza di infezioni pregresse verificatesi all'interno di una determinata popolazione. Il secondo riguarda invece l'analisi delle siero-conversioni entro gruppi omogenei di animali che consente di verificare, in presenza o meno di malattia, la circolazione eventuale di uno o più virus all'interno del gruppo e lo stato d'immunità dello stesso.

* * *

Nel quadro ora menzionato sono state condotte delle indagini sierologiche su gruppi di giovani bovini appartenenti ad allevamenti condotti su strutture e con tecnologie differenti. In particolare tali allevamenti vengono indicati e si caratterizzano come segue.

Azienda A - Si tratta di vitelli da carne importati dall'estero ed il cui ciclo produttivo inizia ad 8 settimane di vita. Il gruppo è costituito da 350 soggetti mantenuti in unico locale, suddiviso internamente in recinti contenenti non più di 16 vitelli. Si applica il sistema del tutto pieno-tutto vuoto e gli animali rimangono nel locale suddetto fino a 2 mesi circa dall'arrivo. Il successivo periodo d'ingrasso si completa presso altre aziende.

Azienda B - La tecnologia di allevamento è completamente diversa rispetto alla precedente nel senso che i vitelli di nuovo acquisto

vengono introdotti in locali contenenti animali di età differente, a ciclo continuo, il che esclude l'applicazione del sistema tutto pieno-tutto vuoto.

Azienda C - Si tratta di un allevamento di bovini da latte nel quale le vitelle destinate alla rimonta vengono allevate in recinti all'aperto fino al momento del primo parto. In tali recinti si osserva pertanto la presenza di animali genericamente giovani ma di età molto diversa. Nel nostro caso è stato preso in esame un gruppo di vitelle omogeneo in rapporto all'età, la cui osservazione è iniziata a 20 settimane di vita.

Gli animali appartenenti ai tre gruppi suddetti sono stati tenuti in osservazione per periodi di tempo variabili e sottoposti a prelievo di sangue agli intervalli che verranno più avanti specificati. Nel contempo essi sono stati seguiti anche clinicamente onde verificare l'eventuale comparsa di sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio. Su ciascun campione di siero è stata effettuata la ricerca di anticorpi nei confronti dei virus Parainfluenza 3 (PI 3), Rinotracheite Infettiva (IBR), Adenovirus tipo 3 (BAV 3), Reovirus tipo 1 e 3 (Reo 1, Reo 3).

Allo scopo suddetto è stata applicata l'Inibizione dell'Emoagglutinazione (IEA) in presenza di antigene PI 3 e la Siero-Neutralizzazione (SN) per tutti gli altri. Nel complesso, l'indagine è stata effettuata onde ottenere informazioni sui seguenti punti:

1) comparsa di siero-conversione attraverso il rilievo della presenza di anticorpi anche alle diluizioni minime saggiate (20 per gli anticorpi IEA, 5 per gli altri);

2) incremento di almeno 4 volte del titolo anticorpale fra due prelievi consecutivi quale documentazione dell'insorgenza di infezioni attive nel corso del periodo di osservazione;

3) presenza di infezioni multiple sullo stesso animale documentabili attraverso la comparsa, nello stesso periodo, di un incremento significativo del titolo degli anticorpi verso due o più virus;

4) eventuali correlazioni fra tipo di allevamento e frequenza delle siero-conversioni.

* * *

Prima di esporre, sia pure in sintesi, i risultati ottenuti, è necessario sottolineare che fra gli animali delle Aziende B e C non è stata segnalata sintomatologia apprezzabile a carico degli organi della respirazione. Fra i vitelli dell'Azienda A si è invece notata l'insorgenza di una lieve sindrome respiratoria caratterizzata dalla comparsa di scolo nasale, modesto aumento della temperatura e depressione del sensorio. Essa si è manifestata a due settimane circa dall'arrivo degli animali ed è regredita spontaneamente entro 3-4 giorni.

I Grafici 1 e 2 illustrano il comportamento delle reazioni sierologiche fra i vitelli dell'Azienda A. Il primo riguarda i virus PI-3 e BAV-3 ed il secondo Reovirus 1 e 3, mancano invece dati relativi al virus IBR in quanto la presenza dei corrispondenti anticorpi non è stata dimostrata fra questi animali.

L'esame del Grafico 1 consente di rilevare che i vitelli in esame hanno presentato in larga misura siero-conversione nei confronti dei due virus considerati nonostante l'andamento generale del fenomeno abbia assunto una fisionomia diversa per PI-3 rispetto a BAV-3. Nel primo caso infatti la percentuale delle siero-conversioni è apparsa molto elevata al primo prelievo (8 settimane di età), si è abbassata nei sieri corrispondenti a 10 e 12 settimane ed è risalita su valori prossimi a quelli iniziali a 16 e 20 settimane. Si osserva inoltre che, sempre in presenza di antigene PI-3, la curva di frequenza delle siero-conversioni assume un andamento parallelo rispetto a quella che indica la media geometrica dei titoli corrispondenti a ciascun prelievo.

Il comportamento delle siero-conversioni in presenza di BAV-3 è diverso nel senso che la loro frequenza, elevata a 8 settimane di vita, subisce un netto e progressivo incremento nel corso del periodo di osservazione, fino ad investire la quasi totalità degli animali in esame. In questo caso non è stato dunque possibile osservare le variazioni di frequenza indicate a proposito delle siero-conversioni verso PI-3. Si è invece confermato il fenomeno in forza del quale ad un incremento di frequenza delle siero-conversioni fa riscontro un aumento della media geometrica dei titoli.

L'ipotesi che i dati sin qui esposti possano essere presi a testimonianza di un'attiva circolazione dei due virus fra gli animali in esame, trova conferma nel rilievo di un significativo incremento del ti-

tolo di anticorpi fra un prelievo di sangue e quello successivo. Come indica ancora il Grafico 1, tale evento si è verificato con frequenza crescente nel tempo per il virus PI-3. Nel caso di BAV-3 esso ha invece presentato un andamento relativamente irregolare ed ha raggiunto la frequenza massima fra la 10ª e la 12ª settimana di vita. Tale situazione deve tuttavia essere attribuita al fatto che, dopo la 12ª settimana, la maggior parte degli animali in esame risultava provvista di anticorpi neutralizzanti ad alto titolo.

È stato infine possibile dimostrare che, sempre a giudicare dall'andamento delle siero-conversioni, ben 6 soggetti di questo gruppo hanno subito infezione contemporanea da PI-3 e BAV-3 entro il breve periodo di 8 settimane.

I dati relativi alla dimostrazione di anticorpi Reovirus 1 e 3 sono schematizzati nel Grafico 2. Esso consente di rilevare che siero-conversione verso entrambi ancora una volta compare in un cospicuo numero degli animali esaminati. Più in particolare si osserva che, nel tempo, ad un aumento di frequenza delle siero-conversioni verso Reovirus 1 fa riscontro un aumento dei titoli di neutralizzazione anche se questi rimangono di entità costantemente modesta.

Per quanto riguarda Reovirus 3, è dato di constatare che la frequenza delle siero-conversioni rimane relativamente costante nel tempo mentre la media geometrica dei titoli di SN risulta spesso di valore più elevato rispetto a quello osservato in presenza di Reovirus 1.

La situazione relativa alla insorgenza di infezioni attive nel corso del periodo di osservazione si prospetta in maniera analoga per i due virus presi in esame. Tale evento ha infatti raggiunto la sua massima espressione fra il secondo ed il terzo prelievo di sangue, effettuato in età compresa fra 10 e 16 settimane, mentre la prova dell'insorgenza di infezioni associate è stata ottenuta, sia pure con frequenza molto variabile, durante tutto il periodo di osservazione degli animali.

La situazione relativa all'allevamento B è stata schematizzata nel Grafico 3 il quale indica che, fra questi animali, si rileva siero-conversione anche nei confronti del virus IBR. Esso, sempre entro un arco di 8 settimane, ha determinato la comparsa di anticorpi nella quasi totalità degli animali esaminati e ciò si è con ogni probabilità verificato a seguito delle numerose infezioni attive che, nel tempo considerato, hanno investito oltre il 70% di essi.

Sempre dall'esame del Grafico 3 si osserva che anticorpi PI-3 sono stati costantemente rilevati in percentuale superiore all'80 mentre la media geometrica dei titoli corrispondenti a ciascun prelievo ha mostrato una tendenza a diminuire in occasione dell'ultimo. Ciò è probabilmente dipeso dal fatto che, nella fase finale dell'indagine, non è stato possibile ottenere la dimostrazione sierologica dell'insorgenza di infezioni attive.

Un comportamento molto simile ha presentato l'evoluzione delle reazioni anticorpali nei confronti di BAV-3. Siero-conversione è stata infati rilevata in quasi tutti gli animali nel corso del periodo di osservazione, tuttavia la media geometrica dei titoli è rimasta su valori relativamente modesti. Tale diffusione di positività sierologiche fin dall'inizio del periodo di osservazione ha forse determinato lo scarso numero di infezioni attive le quali hanno investito il 10% circa degli animali esaminati. Infine, in un solo caso sono stati riscontrati i segni di una infezione contemporanea da virus BAV-3 e IBR.

Per questo gruppo di animali mancano al momento i dati relativi all'andamento delle siero-conversioni nei confronti di Reovirus 1 e 3.

Nel caso delle vitelle dell'Azienda C è necessario precisare subito che la loro osservazione è iniziata quando esse avevano circa 20 settimane di vita e si è protratta per ulteriori 53 settimane. Analogamente a quanto indicato per i vitelli dell'Azienda A, anche in questo caso non è stata rilevata la comparsa di anticorpi IBR.

L'andamento della siero-conversione nei confronti dei virus PI-3 e BAV-3 è stata riscontrata in alta percentuale sia pure con prevalenza del primo (Grafico 4). Inoltre, ad ogni incremento della frequenza delle siero conversioni ha fatto riscontro un parallelo incremento delle medie geometriche dei titoli osservati in ciascun gruppo di sieri.

Per quanto riguarda l'insorgenza di infezioni attive, quelle da PI-3 sono comparse con elevata frequenza nel periodo compreso fra 20 e 26 settimane di vita (52,9%) e corrispondente all'inizio del periodo di osservazione. Tale evento ha investito un numero inferiore di animali nel periodo compreso fra 26 e 58 settimane e si è invece ripresentato con elevata frequenza dopo la 58ª settimana, investendo di nuovo un numero rilevante di animali (41,2%).

Nel caso di BAV-3, l'insorgenza di infezioni attive ha raggiunto

la frequenza massima (47,1%) nel periodo compreso fra 53 e 58 settimane mentre prima e dopo tale periodo si è manifestata con frequenza molto minore e senza assumere l'andamento apparentemente ciclico rilevato a proposito del virus PI-3. Il riscontro di infezioni miste PI-3/BAV-3 è stato ottenuto in tre degli animali di questo gruppo.

Per quanto riguarda il comportamento delle siero-conversioni verso Reovirus 1 e 3, i dati relativi alle vitelle dell'Azienda C riguardano soltanto un arco di vita compreso fra 20 e 32 settimane. L'esame del Grafico 5 consente di rilevare che, ad eccezione del terzo prelievo, la metà circa dei sieri esaminati ha presentato attività neutralizzante dosabile nei confronti di Reovirus 1. Le medie geometriche dei titoli denunciano inoltre che, nella grande maggioranza dei casi, essi sono rimasti su valori relativamente modesti. In presenza di Reovirus 3 la situazione risulta leggermente diversa nel senso che, da un lato, la frequenza dei sieri sprovvisti di attività neutralizzante decresce in funzione del tempo e, dall'altro, si osserva che i titoli di neutralizzazione si collocano su valori più elevati rispetto a quanto osservato per Reovirus 1.

Quanto alla insorgenza di infezioni attive durante il periodo di osservazione, quelle da Reovirus 3 hanno raggiunto la massima frequenza fra il 2° ed il 3° prelievo.

* * *

Quanto finora esposto in ordine alla comparsa di siero-conversione verso virus da ritenere patogeni respiratori si presta a considerazioni diverse che cercheremo di riassumere brevemente.

In primo luogo è necessario richiamare l'attenzione sul fatto che, fra gli animali esaminati e limitatamente al periodo della loro osservazione, non sono stati osservati disturbi né a carico degli organi della respirazione e neppure di altri organi ed apparati. Fanno eccezione i vitelli dell'Azienda A fra i quali è comparsa una modesta sindrome di tipo respiratorio la cui esatta eziologia non è precisabile sulla base delle indagini eseguite.

Tenuto perciò conto che le ricerche riferite riguardano animali da ritenere clinicamente sani, sorprende che in così larga misura essi abbiano mostrato la traccia di infezioni da virus diversi e per lo più

verificatesi entro periodi di tempo relativamente brevi.

Infatti, a parte quanto rilevato a proposito del virus IBR la cui presenza è stata provata soltanto in uno dei tre gruppi di animali, gli altri virus hanno dimostrato di circolare attivamente fra giovani bovini mantenuti in condizioni d'ambiente profondamente diverse fra loro. Peraltro, il comportamento delle siero-conversioni in presenza di IBR e l'andamento della situazione osservata nell'Azienda B, fanno ritenere che gli animali in essa presenti siano esposti al maggiore rischio di virosi respiratoria e ciò trova riscontro anche nell'osservazione secondo la quale, entro un brevissimo arco di tempo, il virus IBR ha provocato infezioni da ritenere attive su base sierologica e riguardanti la quasi totalità degli animali.

È proprio questo comportamento dei vitelli dell'Azienda B, nella quale l'allevamento si svolge a ciclo continuo, che conferma come tale tecnologia offra le condizioni ideali per il mantenimento e la disseminazione dei patogeni respiratori.

Tuttavia, al di là delle considerazioni ora indicate, sorprende il fatto che anche in condizioni d'allevamento profondamente diverse fra loro, come è il caso delle Aziende A e C, si siano verificati i tre fenomeni indicativi dell'esistenza di infezioni da PI-3, BAV-3, Reo 1 e Reo 3. Come più volte indicato, tali fenomeni vanno individuati nel rilievo di siero-conversione, nell'incremento della frequenza delle siero-conversioni in funzione del tempo, nella evidenziazione di incrementi significativi di titolo quale indicazione di infezioni recenti.

L'esistenza di una condizione d'immunità passiva colostrale per giustificare il rilievo di anticorpi nel siero di sangue sembra aver giocato un ruolo minore sui risultati ottenuti. Caratteristica di tale immunità è infatti quella di esaurirsi nel corso dei primi mesi di vita attraverso un progressivo decremento del titolo degli anticorpi passivamente acquisiti. Tale fenomeno, da escludere per le vitelle da rimonta il cui esame è iniziato all'età di 20 settimane, si è verificato, limitatamente al virus PI-3, fra gli animali dell'Azienda A. Si deve però rilevare che, dopo la caduta iniziale fra la 10ª e la 12ª settimana di vita, si è verificato un deciso incremento di frequenza delle siero-conversioni e di attività dei singoli sieri. Tali parametri consentono di ritenere che, almeno nelle fasi terminali del periodo di osservazione, questi animali abbiano acquisito una condizione di immunità attiva nei confronti del virus PI-3.

Un ulteriore elemento di interesse emerge dall'analisi del comportamento delle vitelle dell'Azienda C nelle quali la siero-conversione verso PI-3 e BAV-3 è stata studiata entro un arco di tempo relativamente ampio. Ciò ha consentito di osservare che almeno il primo, ma forse anche il secondo, è in grado di determinare focolai d'infezione in successione ciclica e nei quali appaiono coinvolti anche animali provvisti di anticorpi nel siero di sangue. Più in particolare, la ricomparsa di infezione sembra verificarsi quando l'immunità di gruppo tende a diminuire come risulta dal decremento delle percentuali di siero-conversione e dall'abbassamento globale del titolo dei sieri.

Quanto alla situazione relativa a Reovirus 1 e 3, i risultati esposti sono da accettare con qualche riserva. È nota infatti la possibilità che l'infezione da Reovirus stimoli la comparsa di anticorpi eterotipici rendendo per questo almeno incerta la esatta causa delle siero-conversioni osservate. Tuttavia, a parte l'esigenza di indagini ulteriori volte a meglio precisare il significato dei dati finora disponibili, è ovvio che infezioni da Reovirus si sono verificate fra gli animali delle Aziende A e C, manifestando anche un comportamento simile e svincolato quindi dalle condizioni d'allevamento nelle quali i due gruppi di animali venivano mantenuti. Resta pertanto valida la conclusione secondo la quale Reovirus 1 e 3, da soli o in combinazione, hanno anch'essi attivamente circolato fra i bovini in esame, mostrando un comportamento analogo a quello di PI-3 e BAV-3.

Le ricerche eseguite forniscono una ulteriore e sostanziale conferma alla nozione secondo la quale l'apparato respiratorio del bovino rappresenta la sede di infezioni sostenute da virus di diversa natura, il cui significato nel determinismo di malattia resta ancora da precisare. Sembra infatti che almeno alcuni dei più frequenti patogeni respiratori possano circolare fra gruppi di animali senza determinarvi altro che una reazione immunitaria evidenziabile sierologicamente.

Questo dato di fatto fornisce, sia pure indirettamente, la conferma all'ipotesi secondo la quale i virus da classificare come «patogeni respiratori» non sono per sé stessi in grado di determinare le condizioni patologiche che costituiscono il comune riscontro della pratica clinica. È vero che l'uno o l'altro di essi sono quasi sempre repertabili in corso di malattia spontanea, ma è anche vero che questa

insorge in momenti definiti del ciclo di allevamento e che quasi sempre il reperto microbiologico in corso di malattia denuncia l'esistenza di microorganismi da ritenere di complicazione ed ai quali viene attribuita maggiore importanza nel determinismo di epatizzazione polmonare diffusa e dei sintomi più gravi.

In ordine all'intervento di agenti di natura infettiva, ripetute osservazioni dimostrano che essi costituiscono dei frequenti ospiti delle vie respiratorie e ciò a motivo del fatto che le infezioni virali decorrono in forma clinicamente silente oppure senza conseguenze evidenti sugli animali mentre i batteri di complicazione costituiscono parte della normale flora microbica, almeno delle prime vie aeree. Peraltro questi ultimi assumono la fisionomia di veri e propri patogeni soltanto dopo l'evoluzione di una primitiva infezione virale alla quale viene attribuita la funzione di deprimere l'effetto della *clearance* polmonare e di creare in tal modo le condizioni per la colonizzazione batterica.

Una funzione analoga, almeno a giudicare dai risultati di esperimenti condotti sul vitello e su animali di laboratorio, può essere attribuita a quelle condizioni di stress che derivano dalle esigenze dell'allevamento intensivo, particolarmente nel caso del vitello da carne. Anch'esse infatti agirebbero come depressori della *clearance* determinando le condizioni per l'impianto e la moltiplicazione dei batteri normalmente presenti nell'ambiente esterno o nello stesso apparato respiratorio.

Se ciò venisse definitivamente dimostrato, si giustificherebbe, da un lato, la coincidenza già ricordata fra l'evoluzione tecnologica degli allevamenti e la comparsa di una patologia respiratoria poco evidente nel passato e, dall'altro, la maggior frequenza e gravità delle sindromi respiratorie laddove la tecnologia di allevamento prevede le maggiori forzature. Inoltre, la conferma che le infezioni virali e lo stress ambientale svolgono un effetto analogo su alcune funzioni degli organi della respirazione, potrebbe giustificare l'ipotesi secondo la quale i «patogeni respiratori» svolgono sugli animali una vera e propria azione di stress.

A fronte della predetta ipotesi vale tuttavia la pena di rilevare che le condizioni dell'immunità di base, passiva colostrale o attivamente acquisita, e la possibile evoluzione della stessa sono in grado di influenzare il decorso e l'esito delle infezioni virali, pure o compli-

cate, e ciò costituisce la base per l'impostazione della profilassi immunizzante. In questo senso, particolarmente utili appaiono le risultanze dell'indagine microbiologica ed epidemiologica, dalle quali derivano le cospicue informazioni relative alla nutrita lista degli agenti potenzialmente capaci di provocare infezione respiratoria. Restano ancora e per buona parte da chiarire la natura ed il meccanismo di azione dello stress di origine non infettiva onde verificare la possibilità di prevenirne gli effetti, tenuto anche a mente che le attuali tecnologie di allevamento del bovino costituiscono una realtà da ritenere irreversibile.

— I dati sperimentali cui si fa riferimento sono tratti da ricerche, parte delle quali in corso, svolte nell'ambito del Progetto Finalizzato Virus del C.N.R., co nla collaborazione di C. F. Flamini, E. Bottarelli e G. Allegri.

— Più dettagliate informazioni in ordine al tema generale della patologia respiratoria del bovino sono contenute nella recente relazione: F. Scatozza (1978) *Myxovirus parainfluenzae 3 quale possibile fattore condizionante la comparsa di malattia respiratoria nel bovino.* Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, 32, 98.

T. BAGLIONI

NATURA E RUOLO DI ALCUNI DEI FATTORI PREDISPONENTI L'INSORGENZA DI MALATTIA RESPIRATORIA NEL BOVINO

Premesse di eziologia generale

I fattori eziologici da un punto di vista generale possono essere distinti in *determinanti* e *coadiuvanti.*

Il fattore eziologico determinante è quello che caratterizza la malattia e può essere *sufficiente,* cioè non richiede altra concausa essendo in grado di originare la malattia da solo. Può essere invece *insufficiente* e quindi, pur restando caratterizzante la malattia, richiedere l'intervento di uno o eventualmente di più fattori coadiuvanti.

Il fattore coadiuvante crea a quello determinante la condizione indispensabile perché quest'ultimo possa agire.

In genere la causa eziologica risulta dalla integrazione di più fattori (costellazione dei fattori eziologici - Tendeloo, 1925). Una analisi generale del problema risulterebbe vastissima e non certo contenibile nel tempo a disposizione, pertanto, molto opportunamente al titolo di questa conversazione è stata posta una limitazione: «alcuni dei fattori predisponenti».

* * *

Ai fini della trattazione in argomento hanno importanza particolare i fattori eziologici coadiuvanti la cui natura può essere di ordine biologico, chimico, fisico.

Di notevole interesse, almeno a mio avviso, debbono ritenersi i fattori eziologici coadiuvanti di natura biologica in quanto, rispetto a quelli fisici, o chimici, essi risultano talora di difficile individuazione ed interpretazione e sono ancora oggetto di particolari e continue indagini e di costanti aggiornamenti. Vorrei richiamare l'atten-

zione solo su taluni di essi, ed in forma limitata, scusandomi se, poiché si tratta di fenomeni diversi, pur tutti implicati nel processo difensivo generico verso la malattia infettiva, l'esposizione risulterà più a singoli quadri che come un tutto organico.

* * *

È nozione comune che l'apparato respiratorio, ai fini di impedire la penetrazione di agenti infettanti, possieda una serie di strutture e di attività secretorie di cui si vale: ciglia vibratili, macrofagi alveolari, lisozima, lattoferrina, antitripsina, S. IgA, ecc. per non citare che i principali.

Rinviando, per ragioni di spazio e di tempo, a recenti pubblicazioni sull'argomento (Ballarini G., 1975; idem, 1976; idem, 1978; G. Gialdroni Grassi e G. Grassi, 1977; E. Corbella, S. Ottonello, A. Ubaldi, 1977; S. Mondini, 1978), mi soffermerò, come già detto, su taluni particolari aspetti di difesa generale che ovviamente sono operativi anche nel processo infettivo a carico dell'apparato respiratorio. È evidente come la loro riduzione parziale o totale può rappresentare una efficace causa predisponente l'insorgenza della infezione respiratoria.

* * *

Di essi uno di particolare rilievo, solitamente forse non preso in sufficiente considerazione, è quello relativo all'immunità naturale deputata ad elementi cellulari (fagocitosi).

La fagocitosi, proprietà potenziale di tutte le cellule, è andata perfezionandosi con lo sviluppo e la evoluzione così da essere delegata negli organismi superiori ad elementi cellulari altamente specializzati: i polimorfonucleati neutrofili (microfagi), e le cellule di derivazione dal S.R.I. in senso lato ed i monociti del sangue circolante, questi ultimi di particolare rilievo secondo le moderne concezioni (macrofagi).

La fagocitosi è un atto complesso cui l'elemento deputato adempie sia col captare il materiale da fagocitare, sia col mettere in funzione tutta una serie di attività di carattere enzimatico e secretivo. Rinviando per dettagli ai trattati (Dianzani; Favilli; Covelli e Frati,

ecc.), schematicamente il processo può essere distinto nella prima fase dell'inglobamento del materiale a costituire il fagosoma e quindi (seconda fase) per fusione di questo col lisosoma a formare il fagolisosoma nel suo interno le varie idrolasi acide provvedono alla digestione e demolizione del materiale fagocitato.

Secondo le più recenti acquisizioni i granuli dei polimorfonucleati, da considerare lisosomi veri e propri, possono essere distinti in due tipi: A e B.

I granuli A contengono idrolasi acide, proteasi neutre, mieloperossidasi, NADPH ossidasi, proteine basiche, lisozima (1/3 del totale), fagocitina. Derivano dalla faccia interna delle vescicole di Golgi, sono dotati di una membrana unitaria simile a quella dei granuli B ma più ricca di colesterolo e più povera di fosfolipidi.

I granuli B contengono fosfatasi alcalina, proteine basiche, lattoferrina, lisozima (2/3 del totale), fagocitina.

Nelle ricerche sull'argomento è stata rilevata la presenza anche di granuli C contenenti idrolasi acide, p-nitrofenilfosfato-fosfatasi, più verosimilmente da attribuire ai macrofagi.

Un sistema AMP ciclico-tubulina (quest'ultima costituente fondamentale dei microtubuli e dei microfilamenti) favorisce l'accostamento dei granuli al fagosoma e la loro fusione, mentre colchicina e citocalasina B tendono a bloccare lo spostamento dei lisosomi e quindi la fusione.

Effetto simile avrebbero cortisone, catecolamine, glucagone, prostaglandine, in quanto attivanti l'adenilciclasi e quindi il contenuto in AMP ciclico. Risultati analoghi si otterrebbero bloccando la fosfodiesterasi (caffeina, teofillina).

Alterazioni metaboliche nel settore sarebbero quindi in grado di incidere negativamente sulla fagocitosi ed agire pertanto come causa predisponente.

Sembra che la fusione coinvolga, in prima istanza, i granuli B: le sostanze in essi contenute, tutte ad azione battericida, portano a morte il batterio eventualmente fagocitato. Il successivo accostamento e la fusione al fagosoma del granulo A, oltre a continuare l'azione di cui sopra, immette nel fagolisosoma le idrolasi cui è delegata la digestione del materiale inglobato ed ucciso.

Un importante sistema ad azione battericida è quello della NADPH ossidasi-mieloperossidasi. Il primo termine del sistema, attraverso

un'ossidazione, dà luogo alla formazione di H_2O_2 che il secondo termine trasforma in H_2O ed O atomico con elevata funzione ossidante e battericida (per più ampi dettagli vedi Dianzani).

Un sistema perossidasico ad azione antimicrobica analoga sarebbe presente nel centrifugato di omogenati di macrofagi alveolari di coniglio secondo le ricerche di Paul et al (1973).

Gli AA. riferiscono inoltre che l'attività perossidasica osservata nel macrofago alveolare, differirebbe dalla mieloperossidasi in quanto la prima agisce solo quando l'alogeno è lo iodio, mentre la seconda agisce sia col cloro che con lo iodio.

Il meccanismo d'azione antimicrobico sarebbe diverso nei due sistemi perossidasici, quello dei macrofagi alveolari essendo più simile all'attività perossidasica del rafano. Non risultano informazioni per il bovino.

Le idrolasi lisosomiali sono abbondantemente presenti nei monociti mentre risultano in piccole quantità nei macrofagi fissi. In entrambi mancano sia le proteine basiche che le proteine neutre.

Sia il movimento di queste cellule che l'attività fagocitaria richiedono energia che esse traggono consumando le riserve di glicogeno con glicolisi prevalentemente di tipo anaerobio.

Intimamente legata a questa immunità naturale espletata dagli elementi cellulari è la presenza di lisozima e di lattoferrina, tipici esempi di fattori antimicrobici non specifici e che normalmente non mi sembra vengono tenuti nella giusta considerazione.

Pur non essendo anticorpi esplicano azioni di rilievo sia attraverso un'azione diretta che, come oggi si ammette, potenziando quella anticorpale.

Il lisozima nelle diverse specie sarebbe contenuto non solo nel secreto lacrimale, nella saliva e nel latte nonché nei tessuti intestinale ed alveolare, nei quali verosimilmente potrebbe venir sintetizzato, ma anche nei monociti e nei macrofagi, essi pure probabilmente capaci di sintesi, mentre i polimorfonucleati lo conterrebbero e lo trasporterebbero senza produrlo.

Si sa che il lisozima è scarsamente contenuto nel latte bovino rispetto a quello umano (Reiter, 1978): ma vi è di più. Ricerche di Padgett e Hirsch (1967) condotte comparativamente sul bovino, sull'uomo, sulla pecora, sul cavallo, sul coniglio e sul visone nero hanno dimostrato la presenza di quantità variabili di lisozima nel se-

creto lacrimale di tutte le specie considerate ad eccezione del bovino nel quale il fattore antibatterico non è stato rinvenuto neanche nella saliva, negli essudati nasali e nei leucociti peritoneali.

Cionostante, secondo gli AA., i leucociti polimorfonucleati del bovino hanno proprietà fagocitante e battericida intracellulare verso lo stafilococco albo, la salmonella tifimurium e lo streptococco piogene. Diverse le conclusioni di Buonaccorsi (1978 vedi per più ampi dettagli) che si esprime per una carenza del potere battericida del polimorfonucleato neutrofilo del bovino (scarso contenuto in mieloperossidasi, in glucosio 6 fosfatodeidrogenasi, ecc.).

Sempre secondo Padgett e Hirsch nel secreto lacrimale del bovino risulterebbe presente un fattore antibatterico diverso dal lisozima: esso è distrutto per riscaldamento a 88° per 10 minuti a pH 3, è digeribile dalla tripsina o da proteasi batterica, condizioni tutte che non distruggono il lisozima.

Risulta nel complesso (Reiter, 1978) che, tranne la dimostrazione di un rilevante aumento del lisozima nel latte mastitico, (Korhomen, 1973) abbiamo scarse notizie sulla presenza, sintesi e distribuzione di tale fattore nel bovino.

Si tratta di un problema che va certamente indagato per la sua importanza nel meccanismo patogenetico delle malattie infettive in genere e di quelle dell'apparato respiratorio in particolare. È qui interessante ricordare la segnalazione (vedi Reiter, 1978) di una incapacità battericida del polimorfonucleato dell'uomo ascritta alla mancanza di lisozima e di lattoferrina.

Assai scarse le notizie relative alla lattoferrina. La sua azione batteriostatica e battericida si esplica nei confronti di ceppi batterici che ai fini dello sviluppo hanno esigenza di ferro. Essendo, come la transferrina, la molecola non completamente saturata dal ferro, entrambe esercitano azione batteriostatica sottraendo l'elemento ai batteri.

La proteina ferro-legante è stata isolata dai leucociti e da vari secreti animali.

Scarse sono le informazioni sul suo conto nel bovino; il latte ne contiene meno di quello di donna, mentre in discreta quantità è riscontrabile nel secreto della mammella in asciutta e nel colostro (Reiter, 1978).

* * *

Un altro argomento sul quale mi sembra opportuno soffermare l'attenzione è quello relativo alla immunizzazione passiva neonatale trasmessa col colostro.

Sebbene si possiedano parecchie informazioni sulla situazione di copertura immunitaria dell'animale neonato riferibile all'intestino, assai più scarse sono quelle concernenti l'apparato respiratorio.

Da una recente pubblicazione (Bourne et al., 1978) alla quale si rimanda per più ampi dettagli, risultano talune acquisizioni di particolare rilievo.

Il colostro contiene più IgG che IgA, mentre nel latte si verifica l'opposto; la IgM è relativamente scarsa in entrambi.

In numerose specie di mammiferi la IgA e la IgM risultano prodotte localmente nel tessuto mammario così che, in senso immunologico, si può considerare il colostro come un trasudato del siero ed il latte come una vera secrezione.

L'aumento progressivo della IgA nel latte di scrofa trova riscontro nel fatto che le plasmacellule producenti IgA, già presenti 3 settimane prima del parto nella ghiandola mammaria, predominano in tutti i momenti della lattazione e tendono ad aumentare numericamente insieme a quelle producenti IgG ed IgM, per raggiungere un massimo al picco della lattazione.

Ancora di rilievo l'osservazione di Cebra (1977), il quale, in base anche a precedenti ricerche di altri, sarebbe portato a concludere per la esistenza nella scrofa di un legame intestino-ghiandola mammaria ed a formulare l'ipotesi che cellule IgA-precursore giungano alla mammella dalle placche di Peyer, dove sarebbero state preventivamente stimolate, migrando «allo stadio linfoblastico» attraverso la via linfatica e sanguigna. Così trasferitesi maturerebbero, sintetizzerebbero e secernerebbero le IgA.

Nella specie bovina la situazione appare abbastanza diversa.

Il sistema immune, rispetto ad altre specie di mammiferi, risulta relativamente carente di IgA, eccezion fatta per le secrezioni dell'apparato respiratorio nell'adulto dove, ciononostante, le plasmacellule producenti IgG_1 risultano più numerose di quelle producenti IgA.

Nel colostro e nel latte bovino la più gran parte delle immunoglobuline è di tipo IgG_1; figurano piccole quantità di IgA e di IgM,

di cui il 50% sarebbe prodotto localmente. A differenza di quanto si osserva in altre specie di mammiferi la produzione, in sede mammaria, di immunoglobuline virtualmente si arresterebbe durante la lattazione; la già citata correlazione intestino-mammella esistente nella scrofa in tutti gli stadi di lattazione, agirebbe nel bovino solo durante la fase di produzione colostrale; la ghiandola mammaria durante la normale lattazione non riceverebbe stimoli dall'intestino.

Il comportamento delle plasmacellule nella ghiandola sarebbe consensuale: presenti durante l'ultima fase della gestazione e nello immediato post-partum, scompaiono durante la lattazione.

La elevata concentrazione di IgG_1 nei liquidi intestinali, nelle secrezioni dell'apparato respiratorio (almeno nei giovani soggetti), nonché nel colostro e nel latte lascia supporre che questa immunoglobulina si sostituisca almeno in parte alla IgA nelle difese locali.

A conferma di ciò la IgG_1 del bovino possiederebbe talune peculiari caratteristiche della IgA (via secretoria intracellulare, accumulo sull'apice delle cellule epiteliali delle cripte ghiandolari dell'intestino, resistenza all'azione proteolitica).

Per quanto concerne l'apparato respiratorio nel giovane vitello è stata dimostrata una via secretoria intracellulare per le IgA e una distribuzione delle IgA secretorie di origine colostrale alla superficie della mucosa intestinale. Ciononostante, durante le prime settimane di vita del bovino, nelle secrezioni dell'apparato respiratorio nettamente predominano le IgG_1.

Dalle ricerche di Duncan et al. (1972) il rapporto IgG_1/IgA nei secreti nasali e tracheali del vitello diminuisce costantemente dalla prima alla sesta settimana di vita ma è ancora molto lontano da quel rapporto IgA/IgG_1 di 13:1 che figura nei secreti dell'animale adulto.

Sempre in tema di immunizzazione neonatale sono indubbiamente da ricordare esperimenti che sembrerebbero ammettere la possibilità di trasferire, mediante la poppata, cellule ed immunità mediata da cellule nel suino e nei ruminanti. Il problema è di notevole interesse come argomento di ricerca anche se nelle conclusioni del Seminario sul «Ruolo del colostro in relazione alla immunità ed alla sopravvivenza del neonato di ruminante e di suino» (Ann. Rech. Vét., 9, 177-179, 1978) si raccomanda, per il momento, una certa cautela nell'accettarne le conclusioni.

* * *

Sempre in relazione all'insorgenza di malattie infettive in genere e con *particolare* riferimento all'apparato respiratorio sembra opportuno richiamare alcuni aspetti relativi allo stress ed in *specie* alla sindrome generale di adattamento (S.G.A.). È evidente come in relazione ad essi possano realizzarsi in serie infinite di fattori condizionanti i processi infettivi. Intendo qui richiamare l'attenzione sulle nozioni di resistenza crociata e sul conseguente comportamento della S.G.A.

La esposizione ad un'azione stressante sistemica provoca modificazioni caratteristiche nella resistenza, non solo verso lo stimolo particolare al quale l'organismo è stato esposto, *resistenza specifica* ma anche verso altri stimoli, *resistenza non specifica* o *crociata*. Difatti nella reazione di contro shock durante la fase d'allarme entrambe le resistenze sono aumentate però quella specifica lo è molto di più di quella crociata. Durante la seconda fase della S.G.A. mentre la resistenza specifica aumenta fortemente quella crociata diminuisce. Nella terza fase della S.G.A. (esaurimento) entrambe le resistenze raggiungono livelli veramente minimi (R. Veilleux, 1963).

Un tale meccanismo può certamente avere notevole importanza nella predisposizione all'insorgenza di malattie infettive.

Ancora nel 1959 Locatelli e Quarenghi segnalavano nel bovino neonato, in analogia con quanto riscontrato da altri nell'uomo, la caduta del contenuto di glicogeno nei polimorfonucleati neutrofili da interpretare come probabile conseguenza di effetti stressanti (parto, adattamento al nuovo ambiente, ecc.). Abbiamo visto come la fagocitosi richieda energia e questa venga derivata dal glicogeno cellulare. Tra i fattori predisponenti quindi potrebbe esservi una minore attività difensiva cellulare in relazione anche alla disponibilità energetica degli alimenti.

Che degli stress si accompagnino al trasporto degli animali è indubbio: che questi possano condizionare riflessi sulla immunità naturale e su quella umorale è certo, come dimostrano anche le recenti ricerche di Hartmann et al. (1976) sia negli animali dopo trasporto che dopo induzione sperimentale di stress.

In stretta correlazione risultano taluni aspetti di fisiopatologia da trasporto nel bovino (Agnes et al., 1972, a, b, c, d) compendiabili

in emoconcentrazione, aumento della azotemia, modificazioni delle attività enzimatiche epatospecifiche e muscolo specifiche.

* * *

Sul piano delle possibilità del soggetto a produrre anticorpi va posto in particolare rilievo il grave problema delle micotossicosi. A parte le alterazioni patologiche indotte a carico di vari organi ed apparati, particolarmente il fegato, che indubbiamente compromettono la resistenza organica, va tenuta in debita considerazione l'azione depressiva che talune di esse, fusario-tossine in modo particolare (Baglioni, 1977), esercitano sul sistema linfopoietico, determinandovi lesioni simili a quelle prodotte da raggi X, neutroni, alchilanti, antibiotici tipo puromicina e mitomicina C. Importanza anche maggiore va forse attribuita alle così diffuse infestazioni parassitarie. È noto infatti che nel corso di talune di queste può realizzarsi uno stato più o meno grave di depressione immunitaria oggetto di varie teorie interpretative anche se praticamente ignoti sono i meccanismi alla base di tali depressioni (vedi per dettagli Hudson, 1973).

Quanto precede si riferisce prevalentemente ai meccanismi difensivi che l'apparato respiratorio può mettere in atto contro l'insediamento e lo sviluppo di agenti infettanti ed è evidente che qualsiasi riduzione della loro attività rappresenta una possibile causa predisponente.

Si tratta più di particolari, che di una visione generale del problema, i quali tuttavia mi sembra abbiano significativa importanza e non sempre vengano sufficientemente presi in considerazione.

* * *

Volendo chiudere questo breve intervento mi pare forse più logico avanzare delle domande piuttosto che esprimere delle conclusioni. La prima che ci si può porre è se sul piano dell'immunità naturale il bovino possieda le stesse capacità difensive note per altre specie.

Quali sono le reali capacità fagocitarie e battericide del polimorfonucleato neutrofilo del bovino?

Il lisozima manca nei polimorfonucleati neutrofili e in gran parte

delle secrezioni; se qualche cosa di analogabile esista e come funzioni mi sembra ancora oggi da chiarire.

Le S IgA sono scarsissime nel secreto bronchiale dove dominano nettamente le IgG_1 almeno fino alla 6ª settimana di vita. Vedi caso le affezioni dell'apparato respiratorio di carattere infettivo incidono nel vitello in modo particolare tra i 20 ed i 60 giorni di età.

Per quanto siano state messe in evidenza nel bovino strette analogie fra le IgG_1 e la S IgA, la domanda che ci si può porre è se essa IgG_1 possieda le stesse capacità di difesa immunitaria locale delle S IgA. Queste ultime aumentano notevolmente nel secreto dell'apparato respiratorio del bovino adulto nel quale, per quanto mi consta, la frequenza delle infezioni delle vie respiratorie non è così elevata come nel giovane. Mi sembra questo un argomento che meriti ulteriori approfondimenti.

Che il trasporto determini un'azione stressante sistemica mi pare indubbio. Quale correlazione esista tra insorgenza di malattie infettive dell'apparato respiratorio dopo trasporto ed il fenomeno della resistenza crociata è certamente problema degno di attenzione e di ricerca.

Né vanno trascurate per ultimo le possibili azioni immunosopressive che sembrano conseguire all'azione di eventuali micotossine.

E qui mi rifaccio alla immagine che di questo problema ci dà Pier A.C. (1953): di un iceberg di cui noi vediamo solo la minima parte affiorante alla superficie.

BIBLIOGRAFIA

AGNES F. e GENCHI C.: Considerazioni su taluni aspetti fisiopatologici del trasporto nel bovino. I - Comportamento del quadro ematologico. «Clin. Vet.», *95*, 33, 1972.

AGNES F. e GENCHI C.: Considerazioni su taluni aspetti fisiopatologici del trasporto nel bovino. II - Quadro sieroproteico, glicemia, azotemia, uricemia. «Clin. Vet.», *95*, 65, 1972.

AGNES F., GENCHI C. e SIMONIC T.: Considerazioni su taluni aspetti fisiopatologici del trasporto nel bovino. III - Attività enzimatiche (GOT, SDH, LDH, CPK e fosfatasi alcalina) e creatinina nel siero. «Clin. Vet.», *95*, 97, 1972.

AGNES F., BROGGI E. e GENCHI C.: Considerazioni su taluni aspetti fisiopatologici del trasporto nel bovino. IV - Comportamento di alcuni elementi minerali nel siero (Ca, Mg, Na, K, P).
«Clin. Vet.», *95,* 133, 1972.

BAGLIONI T.: Qualche considerazione sulla patologia da micotossine. «Chin. Vet.», *100,* 841, 1977.

BALLARINI G.: Argomenti di clinica dell'apparato respiratorio degli animali domestici.
«Ed. Ist. Sieroterapico Milanese, 1975».

BALLARINI G.: Seminario di Patologia respiratoria del bovino, 1976.

BALLARINI G.: Le funzioni non respiratorie del polmone.
«Clin. Vet.», *101,* 146-153, 1978.

BOURNE F. J., NEWBY T. J., EVANS P. and MORGAN K.: The immune requirements of the newborn pig and calf.
«Ann. Rech. Vet.», *9,* 239-244, 1978.

BUONACCORSI A.: Malattie condizionate dei bovini. Steatosi epatica e processi infettivi.
«Atti Soc. It. Sci. Vet.», XXXII.

CEBRA J.: Citato in F. J. Bourne et al.

CORBELLA E., OTTONELLO S. e UBALDI A.: Serum antiproteases and respiratory diseases of the horse.
«Fol. Vet. Lat.», *VII,* 258-272, 1977.

COVELLI I. e FRATI L.: Patologia generale.
«Florio edizione scientifiche, ed. 1976».

DIANZANI M. U.: Patologia generale.
«Unione Tipografico Editrice Torinese, ed. 1977».

DUNCAN J. R. et. al.: citato in F. J. Bourne et al.

FAVILLI G.: Patologia generale.
«C.E.A. Milano, ed. 1977».

GIALDRONI G. GRASSI e GRASSI C.: Le funzioni non respiratorie del polmone e loro rapporti con la patologia.
«Rec. Progr. in Medicina», *62,* 593-610, 1977.

HARTMANN H., BRUER W., HERZOG A., MEYER H., RHODE H., SCHULZE F., und STEINBACH G.: Algemeines Adaptationssyndrom (Selye) beim Kalb. 6. Mitteilung.
«Arch. exper. Vet. Med.», *30,* 553-566, 1976.

HUDSON R. J.: Moderated immunologic responsiveness in parasitic infections.
«Adv. Vet. Sci. and Comp. Med.», *17,* 87-117, 1973.

KORHONEN H.: citato in B. Reiter.

LOCATELLI A. e QUARENGHI F.: Comportamento del glicogeno leucocitario nei primi giorni di vita del bovino.
«Atti Soc. It. Sci. et.», *XIII,* 401-404, 1959.

MONDINI S.: Considerazioni in ordine all'ambiente ed alle tecniche di allevamento.
«Atti Soc. It. Sci. Vet.», *XXXII,* 60-77, 1978.

PADGETT G. A. and HIRSCH J. G.: Lysozyme: its absence in tears and leucocytes of cattle.
«Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.», *45,* 569-570, 1967.

PAUL B. B., STRAUSS R. R., JACOBS A. A. and SBARRA A. J.: Function of H_2O_2 myeloperoxidase, and hexose monophosphate shunt enzymes in phagocytizing cells from different species.
«Infec. Immun.», *1,* 338-344, 1970.

PAUL B. B., STRAUSS R. R., SELVARAY R. J. and SBARRA A. J.: Peroxidase mediated antimicrobial activities of alveolar macrophage granules.
«Science», *181,* 849-850, 1973.

PIER A. C.: An overview of the mycotoxicoses of domestic animals.
«J.A.V.M.A.», *163,* 1259, 1973.

REITER B.: Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum.
«Ann. Rech. Vet.», *9,* 205-224, 1978.

VEILLEUX R.: The stress concept as we see it today.
«Adv. in Vet. Sci. and Comp. Med.», *8,* 189-213, 1963.

G. BALLARINI

PROBLEMI DI DIAGNOSI CLINICA NELLE SINDROMI RESPIRATORIE DEI BOVINI IN ALLEVAMENTO INTENSIVO

Premessa

La visita clinica è ancor oggi un «cavallo di battaglia» della medicina veterinaria. Sebbene non possa competere con la schiera delle tecnologie elaborate e costose alle quali ha spianato la strada, non solo resiste tenacemente al pensionamento, ma sta avendo una «nuova primavera» con la visita clinica della collettività (o visita clinica di massa). La sua forza attuale si fonda anche sul dare ai veterinari (ed ai proprietari) il senso della continuità con il passato e la «fiducia» della tradizione. Identificata con la affidabilità della diagnosi, la pratica della visita clinica, con i suoi aspetti «familiari», evoca confidenza e fiducia. Fatto più importante, essa fornisce a quei veterinari che sanno praticarla, informazioni attendibili, immediate e di basso costo, che possono eliminare, od almeno ridurre, la necessità di complicati, lunghi e costosi tests diagnostici.

È facile per il veterinario moderno (o che vuole a tutti i costi apparire tale) inviare animali morti o loro organi, o campioni di liquidi biologici prelevati da animali ammalati, ad un laboratorio per esami diagnostici, invece di esaminare gli animali ammalati (singoli individui, e la intera collettività) mediante una accurata visita clinica. Tali esami di laboratorio sono in genere gratuiti, per cui l'allevatore deve sopportare un basso costo ed il veterinario si scarica di responsabilità. Evidentemente, dal momento che un numero sempre minore di veterinari sono addestrati nelle metodologie della clinica dell'individuo, ma soprattutto della collettività, la scelta della strada della tecnologia è per lo meno prudente, se non «necessaria», ma non è detto che sia la più economica per la collettività ed il servizio sanitario. Non è inoltre possibile espandere un tale tipo di diagnostica a tutti i casi

ed in tutti gli allevamenti: i costi diverrebbero insostenibili ed il sovraccarico di lavoro nei laboratori renderebbe impossibile o per lo meno molto difficile applicare le tecniche di laboratorio nei casi in cui sono veramente indispensabili o comunque altamente utili.

Esiste quindi la necessità della visita clinica come «filtro» del materiale da inviare ai laboratori, ma soprattutto per costruire un quadro nel quale interpretare i risultati delle indagini, e sotto questo profilo lo «scarico» delle responsabilità offerto dal laboratorio è solo parziale, anzi in non pochi casi il veterinario è caricato della «nuova» responsabilità di interpretare la presenza di un virus da lui neppure sospettato. Tuttavia altre considerazioni si impongono. Quando il veterinario del XIX e della prima metà del XX secolo scelse di effettuare la diagnosi basandosi meno sul resoconto verbale del proprietario sui sintomi della malattia e sul suo decorso, e più sui segni fisici di malattia che in molti casi solo lui era in grado di scoprire (non avendo quindi paura di «sporcarsi» nel contatto fisico con l'animale, contatto necessario ad una accurata visita clinica), il veterinario fu anche costretto a concentrare la propria mente sulla malattia, e proprio da questa ricerca opportunamente collegata al riscontro anatomopatologico scaturì la grande rivoluzione della nosografia. Questa situazione contribuì anche a dare al veterinario una giusta fiducia in sé stesso, ed ebbe una importante conseguenza positiva nella sua evoluzione professionale. La seconda metà del secolo XX vede invece veterinari che, per raccogliere e valutare le prove della malattia, sono portati ad avere meno fiducia in sé stessi e più negli specialisti, nei tecnici, nelle «macchine» e tutto questo giustifica anche un palese stato di disorientamento ed una regressione della stessa professione veterinaria. Nei riguardi poi delle sindromi morbose delle collettività animali, le carenze semeiologiche e di diagnosi clinica hanno emarginato il veterinario dagli allevamenti, perché non può essere la terapia l'elemento di differenziazione tra l'allevatore ed un veterinario «senza diagnosi».

Il veterinario per «riconquistare» la clinica deve oggi acquisire le necessarie conoscenze di semeiologia e patologia delle collettività, essendo questa l'unica strada per arrivare ad una soddisfacente nosografia delle sindromi di massa. Limitandoci al problema delle sindromi respiratorie dei bovini, è ormai troppo evidente che l'isolamento di un virus o la identificazione di un movimento anticorpale

in una popolazione, assumono precisi significati solo in rapporto ad una esatta conoscenza dello stato clinico della popolazione e della eventuale malattia. A questo proposito è tuttavia necessario sottolineare che diagnosi clinica e diagnosi eziologica, seppure correlate, non sono sempre e totalmente sovrapponibili, trovando riferimento su piani diversi. Un primo «mito» da sfatare è pertanto quello di arrivare ad uno schema o ad una «chiave» clinica con la quale diagnosticare le sempre più numerose infezioni, soprattutto virali, che singolarmente od in associazione intervengono nella genesi delle sindromi respiratorie dei bovini. Da non trascurare anche che l'apparato respiratorio, come gli altri apparati dell'organismo animale, tende a rispondere in modo uniforme e stereotipato di fronte ad una grande varietà di agenti eziologici

In questo ordine di idee si inserisce la presente esposizione, che per molti aspetti deve essere considerata un «tentativo» ed una «proposta» di una nosografia delle sindromi respiratorie del bovino in allevamento intensivo, offerta per un più ampio confronto con la realtà della patologia dell'allevamento bovino e le sue incessanti modificazioni.

Quadri clinici respiratori nell'allevamento intensivo

Le sindromi respiratorie che dominano negli allevamenti intensivi dei bovini possono essere considerate da due ben distinti punti di vista: come malattie del singolo individuo o come espressioni di una patologia di collettività. L'indirizzo di questa esposizione ci fa ritenere più opportuno mettere in evidenza i quadri clinici presenti nella collettività, nei quali inseriremo alcuni cenni sui più noti aspetti delle malattie nel singolo individuo.

Bisogna inoltre premettere che lo studio sistematico delle malattie respiratorie del singolo animale è stato condotto soprattutto con criteri anatomo-clinici ed ezio-patogenetici, dandoci un quadro (*nosografia*) abbastanza completo e soddisfacente. Ben diversa è invece la situazione relativa alla patologia di massa, per la quale non disponiamo di parametri di riferimento accettati da tutti e nei quali inquadrare le *sindromi respiratorie*. Significativa diviene così la dizione di molti autori americani, che parlano di *Bovine Respiratory Disease Complex* (BRDC), per superare anche le modulazioni delle varie for-

me morbose in rapporto alle singole condizioni ambientali, tipo di associazioni eziologiche, ecc..

Pur non sottovalutando la grande varietà delle forme morbose e la loro *elevata* caratteristica di modulazione, riteniamo possibile, *e utile da un punto di vista pratico,* individuare alcune forme morbose, anche se nel loro insieme non costituiscono *tutta* la patologia respiratoria dei giovani bovini, e nella loro qualificazione non si segue un unico criterio tassonomico.

Nella nostra esposizione considereremo le seguenti forme morbose:

A) Broncopolmonite da stress (broncopolmonite da trasporto o Shipping Fever).

B) Sindrome influenzale.

C) Rino-tracheite infettiva (IBR).

D) Pneumopatie acute dispneizzanti epizootiche.

E) Broncopolmonite enzootica.

Non ci soffermeremo invece, dandole per scontate, sulle tecniche e metodologie semeiologiche necessarie per individuare e quantizzare le turbe morbose sulle quali porre le diagnosi dirette e differenziali relative alla sindromi respiratorie.

A) *Broncopolmonite da stress* (*broncopolmonite da trasporto = Shipping Fever*)

Pur non entrando in merito al problema di una azione patogena primitiva della *Pasteurella,* è indubbio dover constatare che la presenza di questo batterio dà un carattere di notevole gravità alle sindromi respiratorie nelle quali interviene, tanto da venir spesso qualificate «*pasteurellosi*». D'altra parte le sindromi respiratorie in cui è frequente l'azione della *Pasteurella* sono frequenti negli animali di recente introduzione negli allevamenti (malattia da trasporto) e per questo il batterio è di notevole importanza nella patologia degli allevamenti intensivi. Sulla genesi di questa ultima forma morbosa si insiste sulla importanza di *tre* fattori eziologici indispensabili per l'insorgenza della malattia: 1) *condizioni di stress* da trasporto, vaccinazioni, mutamenti nell'alimentazione (svezzamento), fame, sete, ambiente, clima, ecc.; 2) *infezioni delle vie respiratorie da virus* (spesso il virus Parainfluenza 3 o PI 3, ma anche altri); l'infezione può es-

sere in atto, ma nella maggior parte dei casi la malattia è clinicamente superata, pur permanendo lesioni tissutali a livello toracico; 3) *Pasteurella* (la *P. haemolytica* sembra essere quella più importante, ma non può essere trascurata la *P. multocida* tipo A). Nei giovani bovini le infezioni da virus PI 3 sono molto comuni, ma in molti casi *non* sono accompagnate da sviluppo di pasteurellosi. Dall'albero respiratorio dei bovini sono stati isolati molti altri virus, quali *Adenovirus, Rhinovirus* ecc., con azione favorente lo sviluppo di pasteurellosi. Analogamente per i cosiddetti «fattori stressanti», sebbene la pasteurellosi si sviluppi di regola in concomitanza di condizioni stressanti, si può assistere alla comparsa della malattia anche in assenza di stress.

La malattia inizia con anoressia grave, depressione generale, febbre 40,5° C - 42,0° C) ed una tosse moderata, umida e produttiva, che è ben differente dalla tosse aspra e non produttiva della IBR. Lo scolo nasale, sieroso all'inizio, tende a farsi poi mucopurulento ed ostruisce le narici ed insudicia il musello. Un certo grado di epifora può essere considerato normale conseguenza del trasporto, mentre la *stasi del rumine* è un segno costante e caratteristico; una eventuale diarrea non ha invece significato diagnostico preciso. L'esame fisico del torace, e soprattutto la sua ascoltazione, non deve essere trascurato; nella fase iniziale, mentre aumenta la frequenza respiratoria e vi sono fenomeni congestizi, il murmure vescicolare è aspro; dopo 24-36 ore compaiono i rantoli umidi dovuti alla presenza di essudati nell'albero bronchiale. Se tempestivamente si attua un efficace trattamento, l'essudato si essica e si hanno rantoli secchi, sibilanti e fischianti; se la malattia non è trattata, la dispnea è progressiva e compaiono i segni di addensamento broncopneumonico (soffio tubarico, ecc.) ed eventuali sfregamenti pleurici.

La prognosi deve essere da riservata a infausta per i vitelli con grave dispnea, perché ciò è indizio di un processo in atto già da trequattro giorni. Anche in caso di sopravvivenza i soggetti rimangono improduttivi a causa delle gravi lesioni polmonari residuali.

Una *diagnosi differenziale* si impone nei riguardi della IBR, e presenta difficoltà nel singolo animale, molto meno nel caso di forme enzootiche. I bovini colpiti dalla broncopolmonite da stress appaiono più depressi e iporessici di quelli affetti da IBR. Quest'ultima si localizza primariamente nelle vie aeree superiori e non al polmone vero e proprio; nella IBR non sono di solito presenti rantoli ed altre

manifestazioni sonore auscultabili, se non per conduzione tracheale. Peraltro, in molti casi di IBR si possono sviluppare polmoniti secondarie batteriche, prima della visita clinica. Mancano nella polmonite da stress le frequenti placche nasali pseudomembranose e le congiuntivi riscontrabili in non pochi casi di IBR. La risposta della polmonite da stress ai trattamenti antibatterici è eccellente, almeno nella fase iniziale, diversamente dalla IBR.

La *broncopolmonite ab ingestis* si contraddistingue per il rapido sviluppo di uno stato tossiemico, per la comparsa di un quadro eterogeneo di rumorosità broncopolmonari e per l'odore putrido dell'aria espirata.

La *diarrea da virus* (*BVD*) può presentarsi nei giovani bovini all'ingrasso intensivo subito dopo una polmonite da stress; in tal caso il veterinario pensa a forme cronicizzate che non rispondono al trattamento. D'altra parte nella BVD sono noti quadri polmonari. Ai fini diagnostici si ricorda che parecchi bovini, in caso BVD, possono presentare erosioni alla mucosa boccale molto utili per un indirizzo diagnostico.

Nella fase iniziale sono efficaci sulfamidici ed antibiotici ad opportuna posologia e somministrazione per almeno 3 giorni consecutivi, anche se le condizioni sembrano subito migliorare. Sono indispensabili trattamenti individuali agli animali ammalati e spesso è utile associare un trattamento di massa.

I corticosteroidi possono riuscire utili nei casi con estese lesioni polmonari instauratesi a causa del ritardo nell'iniziare il trattamento.

Non sono disponibili al momento vaccini molto efficaci, e soprattutto di *rapida azione* contro la *Pasteurella*. Vaccini ed antigeni multipli (PI-3, IBR, BVD e *Pasteurella*) devono essere usati opportunamente. Nella prevenzione conviene fare leva specialmente sul miglioramento delle condizioni di allevamento e sul «precondizionamento» degli animali, preparandoli gradualmente ai mutamenti di alimentazione e di ambiente, ai trasporti e relative operazioni di carico e scarico, e ad altre situazioni stressanti.

B) *Sindrome influenzale*

È una sindrome molto diffusa, ed in molte zone vengono evidenziate lesioni specifiche in circa il 25% dei vitelli di normale macel-

lazione. Sono colpiti prevalentemente i soggetti dal 1° al 4° mese di vita ed anche più giovani, mentre i vitelli di 6 mesi e più sono assai più resistenti, ma possono divenire portatori e diffusori di contagio.

Tra i possibili agenti causali sono segnalati virus (*Rhinovirus, Reovirus, Adenovirus,* ma soprattutto il *Paramyxovirus parainfluenza 3* - P 13), ma anche *Chlamidia* e micoplasmi, questi ultimi anche come agenti complicanti. *Chlamydia* e soprattutto PI-3 sembrano essere però dominanti. Ad onta della molteplicità degli agenti causali la sindrome clinica ed anatomopatologica è abbastanza uniforme, pur esistenzo modulazioni nella epizootologia, entità e qualità delle complicazioni, quadri clinici, ecc. in rapporto alle condizioni favorenti. Tra gli agenti favorenti sono decisivi sopratutto il superaffollamento degli animali e la ventilazione inadeguata; non sono tuttavia da trascurare la alimentazione carenza di vitamina A, come può avvenire con la somministrazione di mais senza opportuna integrazione), la razza (più grave la malattia nelle razze da carne costituzionalmente di «tipo digerente» e non «respiratorio»). L'ambiente (più grave la malattia negli animali tenuti sul grigliato, che quando sono ammalati giacciono su superfici fredde).

Le *manifestazioni cliniche di malattia* iniziano con una tosse aspra e secca e con scolo nasale mucopurulento, mentre il vitello non ha ancora perduto la sua naturale vivacità. La temperatura oscilla sui 39,5° C - 40,5° C, con modesta accelerazione del ritmo respiratorio e cardiaco. Successivamente l'esame dell'area polmonare mette in luce un aumento del murmure vescicolare e della intensità dei toni cardiaci su tutto il terzo antero-ventrale, in relazione all'epatizzazione e atelettasia del polmone. Nella maggioranza dei casi i soggetti possono venire a guarigione anche senza alcun particolare trattamento; possono però riuscire di vantaggio gli antibiotici a *vasto spettro di azione* soprattutto se sia presente *Chlamydia.* In un certo numero di soggetti colpiti può però svilupparsi una grave broncopolmonite da intervento di batteri di irruzione secondaria, una complicazione che è più frequente in sfavorevoli condizioni ambientali.

Abbiamo già accennato alla «modulazione» della sindrome influenzale in rapporto a condizioni eziologiche, ambientali, razziali, ecc.. Nella recrudescenza delle malattie respiratorie dei vitelli e vitelloni negli allevamenti intensivi dell'alta Italia e da riferire a *sindrome influenzale,* abbiamo potuto mettere in evidenza le seguenti princi-

pali caratteristiche, almeno nei casi più tipici, come quelli che si riscontrano negli allevamenti di vitelli per la produzione di carne, che acquistano gruppi di animali di circa una settimana di vita (vitelli «scolostrati»).

Nella prima settimana dall'arrivo in allevamento i vitelli non presentano in genere alcun sintomo morboso, se non quelli soliti conseguenti allo strapazo del viaggio, stress per il cambiamento di ambiente e di alimentazione, ecc..

Nella seconda settimana dall'arrivo (prima settimana di malattia), un numero variabile di vitelli (talvolta solo il 10%, più spesso il 30-60%, a volte anche l'80%) presentano una malattia caratterizzata da febbre (40-41 gradi centigradi di temperatura rettale), scolo oculare sieroso, qualche colpo di tosse; l'appetito è in genere conservato o solo diminuito. Quello che colpisce maggiormente è che ad alte temperature febbrili *non* corrispondono gravi sintomi di malattia e l'appetito rimane abbastanze conservato.

Nella terza settimana dall'arrivo (seconda settimana di malattia) in una certa percentuale di vitelli malati compaiono evidenti disturbi respiratori: tosse, aumento della frequenza respiratoria, (40-50 e più atti respiratori al minuto), grave abbattimento del sensorio, scomparsa o quasi della fame, temperatura rettale in genere elevata (39,5-40 gradi centigradi), ma talvolta anche normale. Alla visita clinica si può diagnosticare una broncopolmonite acuta diffusa, talvolta con complicazioni pleuritiche. Se non si praticano tempestive somministrazioni di antibiotici o chemioterapici, è facile che l'ammalato venga a morte in due, al massimo tre giorni, per polmonite acuta; gli esami di laboratorio è facile che dimostrino la presenza di una *Pasteurella*. Con trattamenti antibiotici è facile impedire la morte degli ammalati, ma solo una parte guarirà, perché una certa percentuale svilupperà una forma cronica.

Nella quarta settimana dall'arrivo (terza settimana di malattia) un numero variabile di animali (2-10% e talvolta anche percentuali maggiori) sono da considerare «cronici». Ad intervalli più o meno ravvicinati il vitello non mangia, presenta febbre e recrudescenza dei sintomi respiratori (respirazione frequente e difficoltosa, tosse), che porterebbero a morte l'animale se non si intervenisse con antibiotici, che tuttavia risolvono solo parzialmente la situazione, perché sono facili le ricadute: inoltre l'animale non cresce e rimane piccolo e ma-

gro. Alla visita clinica di tali animali, anche negli intervalli tra un «attacco» e l'altro, si rilevano fenomeni di broncopolmonite (soprattutto agli apici polmonari) e pleurite. All'esame di tali soggetti «cronici», morti o macellati, si rileva una broncopolmonite, molto spesso purulenta (ascessi, ecc.) con frequente presenza del *corinebatterio piogene.*

Solo *nella quinta-sesta settimana dall'arrivo dei vitelli* la malattia ha concluso il suo ciclo, salvo la presenza di un numero più o meno elevato di «cronici». Durante tutto il corso della malattia (che dura dalle quattro alle sei settimane) è possibile osservare la morte, improvvisa o quasi, di qualche soggetto.

Le lesioni che si rilevano nell'animale morto sono di solito localizzate al cuore (miocardosi-miocardite, endo-epicardite emorragica, ecc.) e sono accompagnate da edema polmonare. Tali eventi di solito si verificano in soggetti anemici e sono quindi più frequenti negli allevamenti di vitelli per la produzione della carne bianca.

Forme acutissime possono manifestarsi in soggetti al di sotto della seconda settimana di vita, e si presentano con grave debolezza muscolare, dispnea intensa e febbre elevata; la morte non si verifica per complicazioni secondarie, ma ad opera dell'infezione virale primaria.

Quello ora descritto è il ciclo «medio» della malattia in un gruppo di vitelli e può ripetersi, più o meno regolarmente, in ogni partita che viene immessa in allevamento. In genere non sono colpiti i vitelli che continuano l'allattamento sotto la vacca (come a volte gli allevatori usano fare per i vitelli che non si abituano alla tettarella od al secchio).

La sindrome respiratoria ora descritta è causata da infezioni virali che dapprima decorrono senza complicazioni (prima settimana di malattia) e successivamente si complicano con infezioni batteriche (soprattutto da pasteurella e da piogeni, rispettivamente nella seconda e terza-quarta settimana di malattia).

L'infezione virale più frequente è quella da PI 3, ma possono essere presenti anche infezioni da Rhinovirus, Adenovirus, ecc.

Causa facilitante delle infezioni virali, e che condizionano il particolare andamento negli allevamenti intensivi di vitelli «scolostrati», è la precoce interruzione dell'allattamento normale, *ma soprattutto la riunione in gruppi di vitelli di diversa provenienza.* In tale maniera i vitelli senza o con limitata protezione da anticorpi antivirali

provenienti dalla madre (protezione che comunque viene meno dopo il termine dell'allattamento naturale) vengono a contatto con vitelli portatori di virus: vitelli dello stesso gruppo, *o vitelli più anziani dell'allevamento in cui entrano, nel quale la malattia si era già manifestata.* Se l'infezione colpisce i vitelli ancora protetti dagli anticorpi materni, si sviluppa una infezione inapparente e gli animali si immunizzano senza mostrare segni apparenti di malattia, ma se l'immunità materna è assente o scarsa, la malattia si sviluppa prima in forma «pura» (prima settimana di malattia), successivamente «complicata» da batteri vari (seconda e terza settimana di malattia). Se poi gli animali sono in condizioni di carenza (e con anemia) sono facili le complicazioni cardiache.

Diagnosi differenziale. Oltre a tener presente la IBR, la broncopolmonite da stress, la pasteurellosi, occorre ricordare le già citate miodegenerazioni localizzate al cuore o al diaframma. In questi casi manca la febbre e si possono manifestare paresi a carico della muscolatura scheletrica. L'esame anatomopatologico permette una *diagnosi generica* di polmonite virale dei vitelli. Per una *diagnosi specifica* si impone la ricerca dei virus e dei batteri in causa.

Il controllo della sindrome influenzale esige ben precise tattiche e strategie che devono essere stabilite caso per caso e che comprendono misure di terapia, ma soprattutto di profilassi.

La *terapia* deve limitarsi al controllo delle complicazioni batteriche, tramite trattamenti individuali e di massa con antibiotici e chemioterapici; particolarmente efficace risulta nei trattamenti di massa l'associazione di sulfamidici con antibiotici macrolidici, e nei trattamenti individuali antibiotici a vasto spettro e ad alta diffusibilità parenchimale (basso legame farmaco-proteico) ad elevati dosaggi. Gli antibiotici, eventualmente associati a corticosteroidi, devono essere somministrati per periodi non inferiori a 3-4 giorni. Se esistono situazioni di anemia è necessaria la somministrazione di preparati di ferro per via parenterale; in caso di turbe cardiache si potrà ricorrere a cardiotonici (digitalici). Nelle forme croniche agli antibiotici (a dosi elevate, ripetiamo) è bene associare farmaci mucolitici.

La *profilassi* dovrebbe essere basata sulla immunizzazione delle femmine gravide nei confronti dei virus più frequenti nel determinismo di sindromi influenzali, ma purtroppo ciò non è sempre possibile. In modo analogo bisognerebbe far sì che ogni vitello ricevesse

il colostro abbondantemente e precocemente (nelle prime 24 ore, al massimo 36 ore di vita). Se si tratta di nati da primipare bisognerebbe fornire loro il colostro (previamente raccolto e surgelato) prelevato da vacche pluripare e ripetutamente vaccinate, ma anche queste misure sono al di fuori della pratica applicazione da parte di chi acquista i vitelli «scolostrati».

Importanti misure profilattiche applicabili negli allevamenti intensivi che acquistano vitelli di una settimana di vita sono le seguenti:

— Possibilmente acquistare animali che siano preparati al trasporto («precondizionamento»).

— Eliminare fattori ambientale favorenti, isolare i giovani vitelli dai soggetti adulti e comunque più avanti in età, ventilazione adeguata, temperatura ambiente oscillante da 12,5° C a 18,5° C, grado igrometrico dell'aria dal 60% al 65%.

— Mettere in opera efficaci programmi vaccinali.

— Se del caso effettuare trattamenti aspecifici di paraimmunità.

In caso di malattia nell'allevamento bisogna sospendere l'introduzione di nuovi soggetti, almeno per due mesi (e cioè fino al termine de fenomeni clinici). È inoltre opportuno eliminare dall'allevamento gli ammalati cronici, ed è *molto* pericoloso, per ragioni di «uniformità» unire ai vitelli di recente acquisto i vitelli di precedenti partite e rimasti «indietro», perché ammalati e quindi portatori e diffusori di contagio.

C) *Rino-tracheite Infettiva (IBR)*

È sostenuta da un virus del gruppo *Herpes* che può causare varie sindromi cliniche, compresa vulvovaginite pustolosa (IPV), congiuntivite, aborto, sterilità e forme nervose ed enteriche nel giovane vitello. La malattia è largamente diffusa anche in Italia.

Nella forma respiratoria, l'unica che qui considereremo, è costante la presenza di febbre (da 40,5° C a 42,0° C), aumento della frequenza degli atti respiratori, tosse aspra e insistente, congestione della mucosa delle narici con frequente comparsa di membrane difteroidi di colore giallo-biancastro. Uno scolo nasale mucoso filamentoso può divenire purulento per compartecipazione batterica; allo svi-

luppo eventuale di congiuntivite mono o bilaterale si accompagna una intensa lacrimazione. L'auscultazione conferma la presenza di tracheite. A livello polmonare vi è solo un rinforzo del murmure vescicolare. Questo quadro può mantenersi invariato per 10 giorni e nel frattempo la maggior parte dei soggetti viene a guarigione. Nel 10% circa dei colpiti si suole osservare un netto peggioramento: anoressia, fetore dell'aria espirata, dimagramento evidente. La tosse persiste e possono venire espulsi brandelli necrotici di origine tracheale. Una polmonite secondaria è una complicazione frequente; nei casi favorevoli la guarigione definitiva richiede 2-3 settimane.

Una diagnosi differenziale si impone con la pasteurellosi, la «difterite» bovina, la diarrea da virus (BVD), la febbre catarrale maligna e le riniti allergiche. La differenziazione dell'IBR dalla forma «respiratoria» della BVD non è agevole, a meno che quest'ultima forma sia accompagnata da erosioni alla mucosa boccale; possono riuscire utili anche gli esami sierologici abbinati IBR-BVD. La comparsa di lesioni alla mucosa orale non è descritta nella IBR, mentre vi sono erosioni nella BVD; la febbre continua per circa 5-10 giorni e le pseudomembrane nasali della IBR non vengono mai osservate nella BVD. La bassa morbilità, le lesioni oculari e la elevata mortalità possono bastare a differenziare la febbre catarrale maligna dalla IBR. La rinite allergica in forma grave può essere accompagnata anch'essa da dispnea inspiratoria, ma senza la febbre elevata e persistente e le ripercussioni generali della IBR, la rinite allergica può inoltre cronicizzare, mentre non si conoscono vere e proprie forme croniche della IBR.

Le lesioni anatomo-patologiche presentano grande tipicità agli effetti diagnostici. L'isolamento del virus può essere tentato nei casi acuti dal materiale prelevato con tamponi nasali. Anche gli esami sierologici possono fornire utili indizi sulle componenti virali.

Gli antibiotici non sono in grado di modificare il decorso dell'IBR, pur non potendosi escludere il beneficio di una eventuale prevenzione delle complicazioni batteriche. L'impiego associato di antibiotici, di antistaminici e di corticosteroidi sembra poter diminuire l'intensità della febbre. L'IBR non richiede di per sé alcun particolare trattamento, salvo quando compaiono i segni di complicazioni batteriche. La vaccinazione svolge solo limitati effetti se impiegata in animali infetti.

D) *Pneumopatie acute dispneizzanti epizootiche*

Sindromi dispnoiche dei bovini sono note da tempo, in forma sporadica, ma anche a carattere enzootico (Fog Fever, Pneumatosi Linfonodale Cistica e sindromi analoghe) ed epizootico (ad esempio le sindromi «influenzali» caratterizzate da elevata dispnea associata ad enfisema polmonare interstiziale e sottocutaneo). In questi ultimi tempi ha però assunto un particolare rilievo la infezione da *Virus Respiratorio Sinciziale,* che non raramente si correla a sindromi respiratorie acute dispneizzanti di tipo epizootico, con elevata mortalità e pertanto di notevole interesse pratico, soprattutto negli allevamenti intensivi.

La malattia colpisce di preferenza i giovani bovini.

Nei vitelli vi può essere la morte quasi improvvisa di animali (apparentemente) sani, che alla necroscopia presentano polmonite ed un enfisema polmonare (alveolare ed in minor grado interstiziale) di tutto il polmone, di gravità tale da non poter essere ritenuto «vicariante» delle sempre limitate lesioni polmonitiche.

Nei vitelloni la malattia si presenta soprattutto dopo stress ed è più frequente nei periodi autunno-invernali. Nelle forme «classiche» e cioè al primo arrivo in un allevamento od in una regione, la malattia colpisce dall'80 al 100% degli animali. I sintomi sono più marcati e caratteristici nei vitelloni di razze da carne, con alimentazioni «spinte» e del peso di 250-450 Kg. Alla visita clinica gli animali presentano tosse limitata ed intensa dispnea (fino ad atteggiamenti di «fame d'aria»); le lesioni ed i sintomi di rinite e tracheite sono di solito molto limitati; è invece presente un enfisema polmonare acuto, sempre di notevole intensità, che si manifesta attraverso un rilevante aumento della frequenza respiratoria, respiro di tipo addominale quasi sempre discordante, spostamento dei limiti polmonari, aumento (limitato) della sonorità toracica, aumento del murmure vescicolare con rari rantoli a piccole bolle. Contemporaneamente si rilevano turbe cardiocircolatorie: tachicardia e spesso aritmie, polso piccolo. Di norma non si individuano focolai di polmonite o di broncopolmonite. La morte avviene di solito per collasso cardiocircolatorio consecutivo ad insufficienza respiratoria acuta, e questo spiega la sua rapidità e la morte «inaspettata» per chi non abbia eseguito una visita clinica completa, comprendente anche l'apparato cardiocircolatorio. La percen-

tuale di mortalità è tra il 10 ed il 20% dell'allevamento, ma negli animali manifestamente colpiti da malattia in forma grave può anche arrivare al 90 e più per cento. All'esame necroscopico la lesione più evidente è un enfisema polmonare (alveolare ed in minor grado interstiziale) acuto, diffuso a tutto il polmone, ma soprattutto ai lobi basali. Presenti inoltre segni di stasi circolatoria e degenerazione cardiaca. Limitati focolai broncopneumonici sono presenti ai lobi medi e apicali, ma di dimensioni tali da non giustificare un enfisema «vicariante» della intensità riscontrata.

Da un punto di vista della diagnosi clinica differenziale nella Rinotracheite Infettiva (IBR) sono presenti intensi segni di interessamento rinotracheale e le sindromi asfittiche sono dovute soprattutto a fenomeni di broncorrea; i caratteri della tosse di tipo «tracheale» e la intensa scialorrea depongono per l'IBR. Sindromi acute dispneizzanti di natura allergica (allergeni inalatori, reazioni da farmaci, ecc.) sono di agevole individuazione sulla base della anamnesi e del decorso. Un elemento collaterale di un certo interesse sembra infine il fatto che i trattamenti con glicocorticoidi non solo non migliorano la dispnea, ma in non pochi casi la aggravano accelerando la morte degli animali così trattati.

E) *Broncopolmonite enzootica*

Cercando di giungere ad una classificazione eziologica delle affezioni respiratorie dei bovini, si parla di polmoniti pasteurellari, da corinebatterio, stafilococciche, di polmoniti influenzali, di polmoniti virali, ecc. In rapporto alla sede della lesione in ambito polmonare si usano i termini di lobare e lobulare, ma nel vitello in realtà tutte le polmoniti sono delle broncopolmoniti e di tipo lobulare, e se il processo infiammatorio è rapidamente invasivo e colpisce più lobuli contemporaneamente, la lesione può assumere i caratteri clinici di una polmonite lobare. Simili classificazioni non corrispondono però alle esigenze cliniche di massa.

Da un punto di vista della clinica di massa, l'esistenza di più casi di malattie polmonari, non in rapporto a diretta azione di stress o di influenza virale (situazioni già considerate nei precedenti punti) anche se spesso *esiti* o *reliquati* di tali infezioni, assume un andamento enzootico, per cui si parla di *broncopolmonite enzootica.* Nei riguardi

di tale forma morbosa è molto importante una esatta *qualificazione clinica* del singolo soggetto.

D'altra parte questa sindrome (*broncopolmonite enzootica*), soprattutto nella forma di polmonite proliferativa ed iperplastica (successivo punto E2) ha molto spesso una eziologia micoplasmica.

Per questo è utile una classificazione morfologica basata sulle alterazioni macro-microscopiche, studiando cioè i caratteri morfologici della lesione nell'ambito della c.d. broncopolmonite enzootica del vitello. In tale ordine di idee si possono distinguere le seguenti forme:

E 1) broncopolmoniti e polmoniti essudative;
E 2) polmoniti proliferative od iperplastiche;
E 3) forme croniche e complicanze di diversa natura.

E 1) *Broncopolmoniti e polmoniti essudative*

Si possono distinguere i casi in cui predominano fenomeni infiammatori che interessano i bronchi, i bronchioli e gli alveoli (*broncopolmonite*) oppure l'interstizio (*polmonite interstiziale*). L'essudato può presentarsi catarrale nelle fasi iniziali, ma successivamente diviene purulento con formazione di ascessi: in questi casi il processo infiammatorio è solitamente sostenuto dal *Corynebacterium pyogenes*. L'essudato può invece avere, almeno nelle fasi iniziali, un carattere fibrinoso, ed in questi casi è stata molto spesso isolata la *Pasteurella* (nei casi di pasteurellosi l'essudato fibrinoso invade anche i setti interlobulari e la superficie polmonare assume un aspetto marmorizzato).

Da un punto di vista clinico la *broncopolmonite essudativa* ha in genere un decorso acuto con temperatura febbrile, anoressia e grave abbattimento del sensorio, che ricalca il quadro già illustrato per la broncopolmonite da stress. L'ipetermia febbrile ha una fase iniziale breve, a 41°-42°, che può anche passare inosservata; scende poi a 39,4°-39,6°, con intensa dispnea discordante, rantoli crepitanti a grosse, medie e piccole bolle e talora anche fischi e sibili.

La tosse compare in genere a malattia già conclamata. Le localizzazioni polmonari vere e proprie sono prevalenti in sede apicale (lobi anteriori e ventrali) e sono facilmente evidenziabili con la percussione e l'ascoltazione del torace: zone di ottusità e soffio tubario (ben

percepibile appoggiando l'orecchio sulla regione della spalla, anche senza spostare in avanti gli arti anteriori). Possono coesistere lesioni pleuriche e pericardiche a carattere fibrinoso. Il processo infiammatorio si instaura in genere molto rapidamente e la sintomatologia è precoce, caratteristica e ben evidente, specie all'ascoltazione, tanto che spesso non si riescono a percepire i toni cardiaci, coperti come sono dai rumori respiratori. Senza una terapia e talvolta malgrado essa, l'animale viene a morte.

Nella *polmonite essudativa* il processo infiammatorio interessa in maniera preponderante i setti interlobulari con alterazioni all'interstizio alveolare, aree peribronchiali e perivascolari, tessuto settale interlobulare.

Clinicamente questa forma è più grave della precedente e la morte può sopraggiungere in 48 ore per tossiemia, prima che si instauri grave dispnea. La palpazione del torace consente di frequente il riscontro di una dolorabilità locale; alla percussione si riscontra talvolta soltanto un'iperfonesi diffusa; alla ascoltazione di norma si ode un murmure vescicolare rinforzato o zone di ipofonesi e soffio tubario indeterminato specie nelle regioni apicali. Questa forma ha una origine ematogena piuttosto che aerogena, e per questo si associano spesso fenomeni diarroici e le alterazioni polmonari necroscopiche possono variare da piccole lesioni dimostrabili solo microscopicamente a polmoniti di dimensioni lobari.

E 2) *Polmoniti proliferative o iperplastiche*

Con le denominazioni di polmoniti proliferative o iperplastiche si indicano le lesioni nelle quali vi è un «blocco» del normale scambio di ossigeno e di anidride carbonica mediante due diverse modalità:

a) l'epitelizzazione degli alveoli ed un sottile strato di cellule cuboidali riveste le pareti degli alveoli, nonché i dotti alveolari e bronchioli terminali (*«epithelializing pneumonia»*);

b) la comparsa di «manicotti» di tessuto linfoide attorno ai bronchi e ai bronchioli (*«cuffing pneumonia»*).

Nella eziologia dell' *«epithelializing pneumonia»* si distinguono quattro sottotipi: il primo caratterizzato da cellule giganti e da inclusioni citoplasmatiche (*«inclusion body pneumonia»*) è stato posto

in correlazione con una eziologia virale, in particolare con una infezione da virus para-influenzale tipo 3, con malattia ad andamento acuto e morte in 48 ore con rapido aumento della frequenza respiratoria; il secondo sottotipo, con diffusa epitelizzazione alveolare, presenta analogia con le broncopolmoniti parassitarie da *Dictyocaulus viviparus;* nel terzo la epitelizzazione alveolare è limitata alla parte del lobulo a diretto contatto con il bronco o con il bronchiolo e si pensa che tali lesioni originino da traumi bronchiali, come ad esempio avviene nelle bronchiti parassitarie; nel quarto si osserva diffusa fibrosi interalveolare.

La «*cuffing pneumonia*» è stata trasmessa in serie nei vitelli mediante sospensione di polmone e di linfonodi mediastinici e presenta chiare analogie con la polmonite enzootica dei suini, e si pensa ad una significativa importanza eziologica dei PPLO o micoplasmi. L'iperplasia linfoide viene di solito interpretata come una reazione immunitaria, e quanto più persiste nel tempo una determinata stimolazione antigene, tanto più estesa e marcata è l'iperplasia. In relazione al lento andamento dell'infezione da micoplasmi, essa può essere considerata un frequente aspetto finale della malattia, però non esclusivo né specifico, potendosi riscontrarla in altre infezioni.

La *sintomatologia clinica* delle due forme (*epithelializing* e *cuffing pneumonia*) è abbastanza simile e deriva dall'ostacolo allo scambio gassoso meccanicamente provocato dalla epitelizzazione delle pareti alveolari o dalla compressione esercitata dai manicotti di tessuto linfoide che, diminuendo il lume dei bronchi e dei bronchioli, limita l'ingresso dell'aria sino ad impedirlo completamente, con conseguente collasso bronchiale e alveolare.

Da un punto di vista clinico la malattia, anche se l'interessamento polmonare è diffuso, non modifica l'appetito dell'animale ed il sensorio non è particolarmente compromesso. Modico è inoltre il rialzo febbrile. Il quadro clinico è invece dominato da un rapido ed elevato aumento della frequenza respiratoria, che sale a 40-60-70-80 e talora oltre 100 atti respiratori al minuto. Il respiro inizialmente solo frequente, celere e superficiale, diventa poi nettamente dispnoico e l'animale presenta arti anteriori divaricati, testa estesa sul collo, bocca aperta, lingua procidente («fame d'aria»). La tosse, quando presente, è secca e stentata.

Alla percussione si rileva una diffusa iperfonesi e spostamento

dei limiti polmonari. All'ascoltazione il murmure vescicolare è aspro in fase inspiratoria ed espiratoria; quando la frequenza respiratoria supera i 70-80 ati respiratori al minuto è udibile un crepitìo enfisematoso, dovuto alla rottura di piccoli bronchioli in vicinanza della superficie polmonare. Solitamente non si odono rantoli, a meno che non sopravvenga una insufficienza cardiaca (edema polmonare), nel qual caso si percepiscono nei settori toracici inferiori. Questo aspetto sintomatologico attira l'attenzione e giustifica la denominazione di broncopolmoniti «atipiche»: infatti in questi casi non si odono i tipici rumori respiratori delle polmoniti e broncopolmoniti e la diagnosi di polmonite deve essere posta in loro completa assenza, ma considerando i caratteri disfunzionali del respiro.

Il decorso può essere acuto e subacuto; nel primo caso (frequente nella *polmonite epitelizzante*) dominano la dispnea e l'enfisema polmonare e i soggetti colpiti possono venire rapidamente a morte; nel secondo caso (*«cuffing pneumonia»*) la malattia si instaura lentamente e solo nel giro di due-tre settimane si hanno elevati gradi di tachipnea.

E 3) *Broncopolmoniti croniche e complicazioni broncopolmonari*

Le broncopolmoniti croniche non sono rare e conseguono in genere alle forme acute, specialmente alle polmoniti proliferative (*«cuffing pneumonia»*). Le lesioni che le caratterizzano sono, oltre ai reliquati delle polmoniti primarie, le broncoectasie e gli ascessi.

Clinicamente si nota un graduale deperimento con colpi isolati di tosse, ma persistenti. La febbre manca o è contenuta in limiti modesti. Non vi è di solito tachipnea e tanto meno dispnea; il respiro è però aumentato di frequenza e spesso si osservano dicrotismo espiratorio, discordanza e contraccolpo. All'esame semeiologico del torace si rilevano lesioni polmonari, per lo più circoscritte al lobo anteriore o alla parte anteriore dei lobi diaframmatici, ed i reperti plessimetrici e ascoltatori sono scarsi e si limitano spesso ad una asprezza inspiratoria e a rari rantoli e sibili, udibili nella grande maggioranza dei casi soltanto a seguito di inspirazioni forzate, che provocano pure accessi di tosse. Non sono infrequenti fenomeni di riacutizzazione con sintomatologia acuta.

Le complicanze più frequentemente osservate sono l'insufficienza

cardiaca, l'enfisema polmonare e l'edema polmonare (alveolare, interstiziale, con formazione di membrane ialine).

La terapia della broncopolmonite enzootica è individuale e di massa, e dovrà essere compiuta in base ai principi noti.

Conclusioni

Nella nostra esposizione abbiamo illustrato cinque entità nosologiche clinicamente individuabili nell'ambito delle sindromi respiratorie di allevamento dei bovini. La loro individuazione non è conseguente a criteri uniformi (eziologici, epizoologici, semeiologici, anatomopatologici, ecc.) come sarebbe auspicabile o come piacerebbe ad una mentalità «ordinata». Purtroppo l'attuale stato delle nostre conoscenze non permette di proporre una nosografia migliore, a meno di non accettare il già citato «Complesso Respiratorio» che con la sua genericità non scontenta nessuno, ma contemporaneamente è di limitatissima utilità pratica, anche come sistema di riferimento per una interpretazione dei risultati di indagini di laboratorio.

Nella nostra proposta — ci sia concessa una «difesa di ufficio» — abbiamo cercato di essere aderenti alla realtà (molto più complessa di quello che forse non pensiamo) e soprattutto di mettere in evidenza, per ogni forma morbosa, i fattori eziopatogenetici di maggiore importanza, non necessariamente infettivistici (e da qui la «difformità classificativa»), sui quali indirizzare la terapia e soprattutto la profilassi. In questo orientamento riteniamo che la attività del veterinario pratico sarà il miglior banco di prova che potrà non solo confermare, ma soprattutto migliorare lo schema nosografico proposto.

F. VALENZA e F. GUARDA

RECENTI ACQUISIZIONI SULL'ANATOMIA PATOLOGICA DELLE PRINCIPALI MALATTIE RESPIRATORIE DEL BOVINO

Non è certo privo di difficoltà il tentativo di inquadrare da un punto di vista anatomo-patologico le malattie respiratorie degli animali ed in particolare dei bovini. Ciò è dovuto a diversi fattori:

1) Il processo pneumonico nei suoi momenti evolutivi non presenta caratteristiche tali da permettere di risalire all'agente eziologico che l'ha provocato. Infatti la reazione polmonare di fronte ad agenti patogeni di origine biologica o chimica è piuttosto uniforme. Fondamentalmente si possono distinguere morfologicamente tre tipi di lesione: a) polmonite o alveolite; b) broncopolmonite; c) polmonite interstiziale, a seconda della localizzazione iniziale dell'alterazione.

Purtroppo in un tempo molto breve dall'inizio del processo, per le connessioni anatomo funzionali del polmone, le strutture limitrofe a quelle primitivamente colpite sono pure coinvolte, per cui gli alveoli, i bronchioli, i bronchi di calibro diverso e l'interstizio possono essere compartecipi allo stesso fenomeno reattivo.

Un'altra difficoltà diagnostica è costituita dalla frequente complicazione batterica secondaria che altera ulteriormente con lesioni di natura prevalentemente purulenta il quadro morfologico primitivo.

2) Gli agenti patogeni polmonari sono molto numerosi e comprendono i patogeni biologici quali virus, batteri (compresi micoplasmi e clamidie) protozoi, miceti, metazoi, oltre ad agenti di natura chimica o fisica.

3) Non sempre l'agente isolato dal polmone leso è la causa della alterazione poiché può essere intervenuto secondariamente oppure ancora può essere soltanto una concausa. Spesso infatti assume un ruolo decisivo per l'insorgenza della malattia polmonare l'intervento di diversi fattori stressanti di vario genere quali per esempio trasporti, sovraffollamento, cambio di alimentazione, di temperatura ecc.

Per questi motivi sono particolarmente difficoltose le correlazioni anatomo-patologiche ed eziologiche, salvo alcuni casi nei quali si riscontrano elementi caratteristici, quali i corpi inclusi in alcune malattie virali oppure si osserva lo stesso agente eziologico, come nelle micosi e nelle malattie da protozoi.

Pertanto per la diagnosi delle malattie respiratorie è sempre più importante e necessario lo studio multidisciplinare e la correlazione di specialisti delle diverse discipline quali l'immunologo, il virologo, il batteriolôgo, il clinico, l'epidemiologo. L'anatomo-patologo costituisce pure un anello importante della catena diagnostica che, pur con i suoi limiti, deve sfruttare tutti gli elementi morfologici a sua disposizione, sia macroscopici, sia istopatologici, sia al microscopio elettronico, al fine di portare un contributo al problema diagnostico.

Tra le varie classificazioni delle malattie respiratorie del bovino ci è sembrato che quella eziologica rispondesse meglio alla realtà, nonostante tutte le incertezze delle nostre conoscenze in proposito, e fosse la più idonea per un tentativo diagnostico, correlando i dati morfologici osservati e gli agenti identificati.

La nostra trattazione, ricavata in base ai diversi lavori degli AA. che si sono occupati di tali problemi ed integrata con le nostre esperienze personali, prende quindi in considerazione le malattie respiratorie del bovino provocate principalmente da virus e batteri, che in questi ultimi anni hanno assunto un ruolo predominante soprattutto negli allevamenti intensivi, quelle provocate da miceti, da micotossicosi e quelle causate da fattori chimici alimentari. Questi ultimi gruppi, anche se non ancora molto frequenti nei nostri allevamenti, costituiscono un potenziale pericolo in un prossimo futuro e devono essere distinti dai primi in base ad elementi diagnostici differenziali.

Innanzitutto però è necessario rilevare come già durante la vita fetale il polmone possa essere sede di lesioni, anche se non esplica ancora le sue attività fisiologiche. Questo fenomeno assume una notevole importanza epidemiologica in quanto per es. i vitelli che nascono vivi e vitali, ma con infezione congenita, sono immunologicamente depressi e maggiormente predisposti ad una nuova eventuale infezione nel periodo perinatale e possono costituire focolai di diffusione di nuove infezioni.

Non è da sottovalutare poi il fatto che le eventuali lesioni pre-

senti nel polmone alla nascita, possono in teoria regredire oppure evolvere ed aggravarsi provocando la morte del soggetto in breve tempo.

La patogenesi di queste lesioni polmonari fetali può essere molto varia, ed essere l'espressione di una infezione sistemica come nella Parainfluenza 3 e nella salmonellosi oppure ancora per l'inalazione attiva del liquido amniotico contenente germi e meconio probabilmente in associazione ad ipossia fetale.

Nei feti bovini abortiti non è raro infatti rilevare lesioni polmonari (fig. 1) che in base alla nostra esperienza e ad una revisione della letteratura in proposito possono essere sintetizzate nello schema seguente:

PATOLOGIA POLMONARE FETALE

Agente causale	Lesioni
Virus IBR (Rinotracheite Infettiva)	Polmonite interstiziale e fibrinosa; emorragie sottopleuriche, piccoli focolai di necrosi.
Virus BVD (Diarrea Virale - Malattia delle Mucose)	Iperplasia linforeticolare, focolai di necrosi; nei feti di età inferiore a 150 giorni bronchiolite necrotizzante.
Virus PI 3 (Parainfluenza 3)	Iperplasia linforeticolare, polmonite interstiziale.
Citomegalovirus	Iperplasia dell'epitelio alveolare con corpi inclusi intranucleari.
Clamidia	Polmonite interstiziale acuta; alveolite; emorragie.
Brucella	Polmonite e bronchite catarrale purulenta; emorragie sottopleuriche; pleurite siero-fibrinosa.
Corynebacterium pyogenes	Bronco-polmonite purulenta.
Haemophilus somnus	Polmonite fibrinosa a focolaio; trombi fibrinoidi nei capillari alveolari; emorragie.
Neisseria ovis	Lieve iperplasia linfo-reticolare peribronchiale.
Streptococchi	Polmonite fibrinosa ed interstiziale.
Bacillus cereus	Focolai di broncopolmonite, pleurite fibrinosa, polmonite interstiziale.
Miceti (*Aspergillus, Mucor*)	Bronchite e polmonite interstiziale o broncopolmonite purulenta; presenza di asteroidi o *club colony*.

TABELLA 1 — Malattie nelle quali è possibile reperire corpi inclusi specifici che permettono, qualo senti, di formulare una diagnosi eziologica *.

Agente causale	Corpi inclusi		
	Periodo di presenza nell'epitelio respiratorio	Tipo	Sede
PI 3	5 giorni dopo infezione con scomparsa dopo il 7° giorno	Intracitoplasmatico eosinofilo	Epitelio alveolare e m alveolari
Adenovirus	7 giorni dopo infezione	Intranucleare eosinofilo o basofilo	Epitelio bronchiale ed a
IBR	2 giorni dopo infezione con scomparsa al 3° giorno	Intranucleare	Epitelio tracheo-bronchia
BRS	Assenza di corpi inclusi	Presenza di corpi inclusi eosinofili in colture cellulari sot ad infezione	
Clamidie	Assenza di corpi inclusi	Presenza di corpi elementari in colture cellulari sottoposte zione	

* I dati esposti in Tabella sono soltanto orientativi e frutto di riproduzione sperimentale delle forme morbose indicate. L'e assenza di inclusi nei periodi esposti in Tabella non può escludere con certezza la presenza degli agenti indicati.

1) Virus

La polmonite ad eziologia virale nei bovini, intesa nella sua generalità, è una sindrome altamente infettiva e contagiosa di non estrema gravità, almeno inizialmente, che però spesso viene complicata e di molto aggravata da germi di irruzione secondaria. Gli agenti virali che possono provocare lesioni polmonari sono molteplici e tra i più patogeni per l'apparato respiratorio del bovino annoveriamo:

Parainfluenza 3 (PI 3)
Rinotracheite Infettiva (IBR)
Adenovirus (sierotipi diversi)
Respiratorio Sinciziale (BRS)
Reovirus
Rhinovirus

Per la loro epidemiologia ed insorgenza assumono particolare importanza i fattori stressanti predisponenti.

Passiamo ora a descrivere a grandi linee le alterazioni anatomo-istopatologiche dei singoli patogeni.

Parainfluenza 3 (PI 3)

È un'infezione sostenuta da Myxovirus parainfluenzae 3 alla quale si associano numerose specie batteriche quali *Pasteurella multocida, Bordetella* spp., *Corynebacterium pyogenes, Spherophorus* spp., Micoplasmi ecc.

Macroscopicamente sono evidenti ampie aree di atelettasia agli apici polmonari con estesi focolai di epatizzazione rossa lobulari particolarmente frequenti nei lobi anteriori e nella porzione ventrale dei lobi diaframmatici.

Nel contesto della flogosi da PI 3 si osserva una polmonite interstiziale e nella forma sperimentale si è notata una reazione prevalentemente proliferativa che colpisce l'epitelio bronchiolare ed alveolare.

L'epitelio bronchiolare prolifera e si formano sincizi di cellule giganti sulla linea di rivestimento bronchiolare dovuti alla fusione di cellule epiteliali a volte accompagnata da fenomeni di desquamazione e necrosi.

A livello alveolare è possibile reperire un fluido proteico conte-

nente prevalentemente elementi mononucleati e detriti cellulari. Riproducendo sperimentalmente la malattia si è vista una bronchiolite con focolai degenerativi delle cellule epiteliali bronchiolari associata a flogosi neutrofilica che si può estendere agli alveoli che non sono collassati.

Anche l'epitelio alveolare va incontro ad una iperplasia (vera epitelizzazione) conseguente a fenomeni degenerativo necrotici, con conseguente formazione di sincizi di cellule giganti; un dato quasi costante della PI 3 è la presenza di *inclusioni* intracitoplasmatiche prevalentemente eosinofile che, riproducendo sperimentalmente la malattia, si è constatato essere presenti a partire dal 5° giorno dall'infezione e durare solo 2-3 giorni.

I corpi di inclusione sono anche reperibili nelle cellule degli epiteli delle prime vie aeree e nei macrofagi alveolari.

Sono presenti a volte cellule giganti nei linfonodi bronchiali.

Rinotracheite infettiva (IBR)

Alle forme più lievi in cui si riscontra macroscopicamente una iperemia limitata alla mucosa nasale e delle prime vie aeree fa riscontro un grave processo flogistico fibrinoso anche di tipo difteroide nei primi tratti respiratori e nella trachea. È frequente osservare corpi inclusi intranucleari nelle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio in modo particolare a livello tracheo-bronchiale. La diagnosi anatomopatologica si basa sulla presenza di pseudomembrane di fibrina e flogosi purulenta a livello laringo-tracheo-bronchiale (fig. 2). Sono frequenti le complicazioni batteriche secondarie al polmone. La lesione fondamentale a livello bronchiale è data da una flogosi bronco-bronchiolare a sfondo necrotico con presenza di essudato che, frammisto alle cellule desquamate, può occludere le vie aeree e presenza conseguente di essudato nel parenchima. Infine istologicamente nella mucosa nasale è presente una infiltrazione di leucociti nella tonaca propria e sottomucosa con conseguente necrosi e desquamazione dell'epitelio di tale tratto.

Adenovirus

Macroscopicamente si osservano, specie nell'area ilare, zone rosso-violacee di collasso associate ad aree enfisematose.

Istologicamente si può reperire una lieve tracheite con perdita delle ciglia ed iperplasia epiteliale.

La lamina propria presenta una infiltrazione di mononucleati associata ad edema che può anche estendersi all'epitelio. I bronchioli denotano iperplasia, pseudostratificazione o mancata differenziazione epiteliale. L'epitelio bronchio-bronchiolare è in preda a flogosi e conseguente necrosi delle cellule epiteliali, le quali si conglutinano denudando aree di rivestimento e cadono nel lume dei piccoli bronchi con conseguente collabimento degli alveoli sottostanti. Attorno ai bronchioli ed ai vasi sanguigni si possono reperire manicotti di elementi mononucleati. Un certo accumulo leucocitario associato all'ispessimento reticolare fa protundere la parete degli alveoli collassati.

Nel lume alveolare è presente un essudato la cui parte figurata è principalmente rappresentata da linfociti (o plasmacellule).

Anche i linfonodi toracici presentano iperplasia nodulare evidente. Nelle cellule dell'epitelio alveolare e bronchiale sono reperibili *corpi inclusi intranucleari* dapprima granulari ed acidofili che in seguito a condensazione dei granuli divengono basofili. Tali inclusi si possono anche trovare nei linfonodi bronchiali, nei macrofagi e nelle cellule reticolari dei follicoli reattivi.

Secondo indagini di infezione sperimentale le inclusioni in questione sono più numerose circa 7 giorni dopo l'infezione e di durata limitata.

Reovirus

Si osserva una flogosi parenchimale concomitante a quella interstiziale. Generalmente i setti interalveolari sono sede di una infiammazione con infiltrato linfocitario-plasmacellulare, macrofagi con essudazione fluida siero-fibrinosa ed aumento della componente connettivale fibrosa. Le cellule alveolari epiteliali a volte sono iperplastiche; nel lume alveolare si possono rinvenire macrofagi, cellule libere e solo raramente neutrofili.

Virus Respiratorio Sinciziale (BRS)

I polmoni degli animali che vengono a morte nella fase acuta si presentano aumentati di volume e di peso notevole. Frequentemente essi collassano e le pleure sono lisce e lucenti. Alla superficie

di taglio è visibile una varietà di colore dal giallastro al rosso cupo.

Una broncopolmonite catarrale di tipo lobare è rinvenibile nei lobi apicale e cardiaco. L'interstizio è sede di flogosi associata ad edema. Focolai di polmonite sono riscontrabili agli apici (fig. 3). Istologicamente si osserva un marcato enfisema polmonare con infiltrazione gelatinosa dell'interstizio. Le pareti alveolari sono infiltrate da elementi mononucleati. È presente una peribronchiolite con metaplasia squamosa delle cellule della mucosa mentre il lume dei bronchi è parzialmente ostruito da neutrofili e da cellule desquamate. Tutto ciò è conseguenza ed esito della flogosi catarral-purulenta, necrobiosi e necrosi della mucosa. Non è reperto costante, ma a volte è presente pure una infiltrazione della sottomucosa. La parete alveolare appare iperplastica ed ispessita e costantemente è presente una desquamazione delle cellule alveolari. Nel lume alveolare si trovano aggregati cellulari intimamente tra loro uniti e formazioni di tipo sinciziale nelle quali sono visibili i rispettivi nuclei cellulari con possibili residui delle membrane cellulari (fig. 4). A volte i sincizi prendono forma di cellule giganti con una membrana esterna unica che ingloba molti nuclei a varia disposizione. Non rari sono gli aggregati uniti «a ponte» alla parete alveolare mediante sottili filamenti. Nel tessuto interstiziale si osservano neutrofili immersi in un essudato siero-fibrinoso. I linfonodi bronchiali sono sede di un edema cortico-midollare con ipoplasia linfocitario-reticolo-endoteliale. Le cellule giganti sinciziali sono più grandi ed hanno più nuclei di quelli presenti nell'infezione da PI 3. Non si osservano inclusi eosinofili citoplasmatici che sono invece presenti nelle colture cellulari infettate con virus BRS. I sincizi si osservano generalmente 14-21 giorni dopo l'infezione.

Rhinovirus

In genere le lesioni sono limitate ad una flogosi delle prime vie aeree di tipo non purulento, a meno di complicanze batteriche. Nel polmone si osserva enfisema.

2) Batteri

In questo gruppo di potenziali agenti responsabili di infezione respiratoria nel bovino sono anzitutto da annoverare le Clamidie, bat-

teri parassiti obbligati, le cui dimensioni oscillano fra 300 e 400 nm. e che sono in grado di determinare la formazione di corpi elementari nelle cellule infette. L'isolamento di stipiti di *Chlamydia* è stato segnalato a partire da numerosi vitelli con malattia respiratoria e, dopo infezione sperimentale, essi provocano una intensa risposta neutrofilica che è contrastante con la reazione virale di tipo prevalentemente proliferativo.

Macroscopicamente, i lobi anteriori del polmone possono presentare una epatizzazione rossa associata a tracheo-bronchite con essudato mucoso. Istologicamente si osserva in genere una flogosi broncopolmonare essudativa che sembra prendere origine al centro dei bronchioli respiratori con successiva estensione centrifuga agli alveoli confinanti.

Un fenomeno degenerativo-necrotico dell'epitelio bronchiolare, con conseguente caduta nel lume di cellule morte, può portare a parziale o totale occlusione del lume stesso.

A livello degli alveoli dobbiamo distinguere: quelli al centro del processo sono sede di una infiammazione essudativa con neutrofili. Gli alveoli più eccentrici sono repleti di liquido infarcito di cellule infiammatorie di tipo vario ma con netta predominanza di mononucleati. Cellule di tipo linfo-reticolare sono a volte presenti formando manicotti perivascolari e peribronchiali.

Per quanto riguarda i Micoplasmi, è da ricordare l'isolamento di almeno 20 specie diverse dall'apparato respiratorio del bovino. Fra esse, le più patogene sembrano rappresentate da *Mycoplasma bovis, Mycoplasma dispar* cui si aggiungono alcune specie di *Acholeplasma.* Tuttavia, quali agenti d'infezione sono segnalati anche *M. arginini, M. bovirhinis, M. bovigenitalium.*

I reperti anatomo-istopatologici nelle polmoniti micoplasmiche possono essere considerati tra loro sovrapponibili. Le parti del polmone più colpite risultano i lobi anteriori. Istologicamente la lesione fondamentale è rappresentata da una polmonite tipo «a manicotto»: i bronchi, specialmente i più piccoli, risultano circondati da accumuli linfoidi che possono inguainare il bronchiolo per tutta la lunghezza e talvolta questi linfociti si infiltrano pure nella lamina propria. A livello alveolare accanto ad alcune unità collassate si possono osservare flogosi neutrofiliche con macrofagi, plasmacellule e rare cel-

lule giganti. È stato inoltre osservato che in genere negli animali più giovani gli aggregati linfocitari formano uno strato diffuso attorno ai bronchioli.

Per completare il quadro delle affezioni polmonari da Micoplasmi bisogna ancora considerare la «pleuropolmonite contagiosa» sostenuta da *Mycoplasma mycoides,* ma a questo riguardo non c'è nulla di nuovo da aggiungere alle lesioni descritte nei classici trattati.

Oltre a Micoplasmi e Clamidie è da segnalare l'esistenza di numerosi altri batteri potenzialmente patogeni per il polmone bovino. I più frequenti sono rappresentati da *Pasteurella multocida, Pasteurella hemolytica, Corynebacterium pyogenes, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Klebsiella* ecc.

In generale, l'estensione ed il tipo delle lesioni polmonari possono variare notevolmente ma uno dei reperti più costanti è la pleurite fibrinosa. Secondo esperienze anglo-sassoni si può affermare, in base al reperto istologico, che le bronco-polmoniti degli animali più giovani, di 2-3 mesi di età, sono di tipo prevalentemente essudativo, mentre negli animali più vecchi la reazione è di tipo prevalentemente proliferativo con linfociti. Non infrequentemente si osservano forme intermedie specie in concomitanza di complicanze quali ascessi, bronchiectasie ecc. Inoltre, le pasteurelle sono di importanza notevole nelle complicanze di molte forme polmonari virali o multiple quali ad esempio le *febbre da stress* e la polmonite enzootica.

3) Miceti

Tra le polmoniti micotiche certamente la più frequente è quella sostenuta da *Aspergillus* spp. ed in modo particolare da *Aspergillus fumigatus*. Soprattutto negli animali giovani prevale la forma di aspergillosi acuta e fatale che si differenzia da quella dell'uomo ed indubbiamente riflette il grande rischio di esposizione dei giovani soggetti ad inalare forti dosi di spore da alimento ammuffito.

Si distinguono tre sindromi fondamentali:

1) *Aspergillosi benigna sub-clinica*: si osserva unicamente nella bovina lattifera; anatomo patologicamente nel polmone si osservano focolai grigio-biancastri di 1-1,5 mm. di diametro in numero variabile preferibilmente protundenti sulla superficie pleurica.

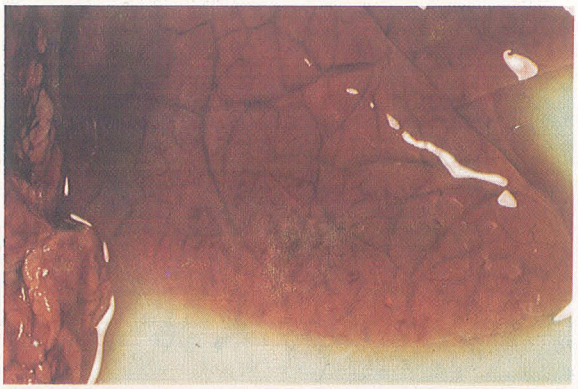


Fig. 1 - Polmone di feto bovino abortito per brucellosi. Si osservano i focolai emorragici sottopleurici ed il notevole edema interstiziale. Sui margini del polmone si osserva il liquido defluito.

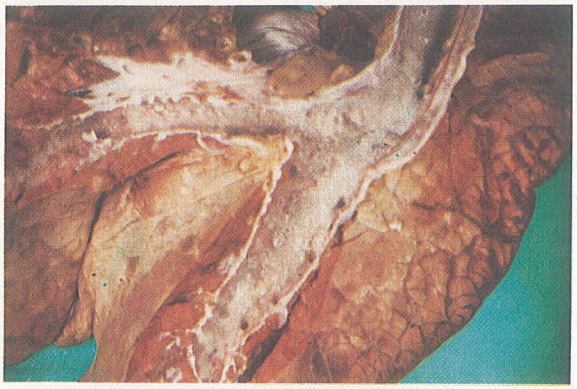


Fig. 2 - Polmone di bovino con IBR: a livello tracheo-bronchiale si osserva un abbondante essudato fibrin-purulento.

Fig. 3 - Aspetto macroscopico del polmone di bovino con polmonite sinciziale: si noti la flogosi al lobo apicale e medio ed il grave enfisema.

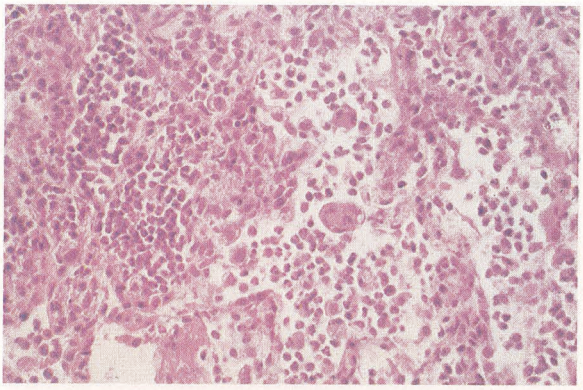


Fig. 4 - Sezione istologica del caso precedente con accentuata flogosi alveolare e presenza dei sincizi.
(E.E., medio ingrand.)

Fig. 5 - Sezione di polmone di vitello di 20 gg. di età con numerosi noduli biancastri di aspetto lardaceo sparsi sul parenchima provocati da Aspergillus spp.

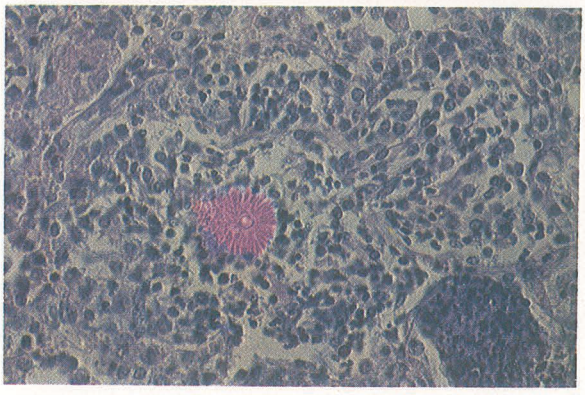


Fig. 6 - Sezione istologica dello stesso polmone della figura precedente. Si osserva un c.d. asteroide attorno ad un'ifa e nel tessuto polmonare attiguo fenomeni flogistici che in alcuni punti sono di natura purulenta.
(E.E., medio ingrand.)

2) *Aspergillosi acuta*: prevalente nei vitelli, causata da inalazione di forti dosi di spore. Nel polmone sono presenti focolai di 3-4 mm. di diametro, biancastri o grigiastri, di aspetto simil lardaceo, associati ad una congestione massiva dell'organo. La morte avviene, generalmente all'improvviso, talvolta entro i 5 giorni dopo la nascita, mentre la sopravvivenza oltre i 15-25 giorni porta alla cronicizzazione delle lesioni. Tale forma potrebbe anche essere di origine congenita.

3) *Aspergillosi cronica*: anatomo patologicamente le forme possono essere molto varie; prevalgono le bronchiti e le polmoniti con presenza di grossi focolai granulomatosi giallastri (fig. 5) sino a 2 cm. di diametro.

Istologicamente le lesioni benigne sub-cliniche sono minute e delimitate da un vallo clavato eosinofilico a struttura radiale che è denominato «asteroide», all'esterno del quale si osservano cellule epitelioidi ed una capsula fibrosa (fig. 6). Tali formazioni sono simili a quelle osservate nell'actinomicosi ed in altre micosi.

Nella forma acuta le lesioni sono caratterizzate da una intensa infiammazione focale. Al centro sono presenti ife. La lesione iniziale è costituita da una intensa reazione granulocitaria negli alveoli. Come il fungo cresce la reazione acuta rimane periferica e la zona centrale si riempie di cellule mononucleate.

La lesione diventa a poco a poco più voluminosa per la confluenza di più focolai comprimendo le zone polmonari periferiche. L'evoluzione può continuare per molto tempo ed assomigliare all'aspergilloma dell'uomo con formazione di cellule giganti.

Coccidioidomicosi: è una malattia poco frequente nel bovino. Le lesioni polmonari assomigliano a quelle tbc, più o meno confluenti con o senza suppurazione o calcificazione, sotto forma di noduli che possono essere circondati da tessuto di granulazione. I linfonodi risultano ingrossati e contengono pus giallastro. Istologicamente, nel bovino, le sferule ripiene di endospore sono circondate generalmente da strutture radiali a corona somiglianti alle rosette actinomicotiche.

Farmer's lung o alveolite allergica estrinseca. È una malattia dell'uomo ben conosciuta nei paesi anglosassoni. Sono conosciute forme sovrapponibili nel bovino e nel cavallo. Eziologicamente si tratta di una risposta allergica iperergica tipo fenomeno di Arthus da parte

dell'uomo o dell'animale alla presenza di fieno ammuffito contenente spore di *Micropolyspora faeni*. Negli animali è stato dimostrato il ruolo eziologico che possono avere anche Actinomiceti ed Aspergilli termofili e mesofili. La malattia nel bovino può decorrere in forma acuta e cronica.

Macroscopicamente i polmoni degli animali morti nei primi stadi di sviluppo si presentano con numerosi piccoli focolai miliari giallo-grigiastri distribuiti irregolarmente sulla superficie pleurica. Ad una evoluzione più avanzata i lobi anteriori sono maggiormente consistenti e gli alveoli periferici dei lobuli sono dilatati per cui si osserva un alone chiaro che circonda una zona centrale iperemico-emorragica di colore rosso scuro. I linfonodi sono ingrossati e di colorito scuro.

Istologicamente si nota infiltrazione flogistica dei setti alveolari con granulociti eosinofili, linfociti, plasmacellule e cellule interstiziali. Negli alveoli è presente essudato fibrinoso, globuli rossi, neutrofili, macrofagi e membrane ialine. Inoltre si osservano granulomi epitelioidi con cellule giganti da corpo estraneo, bronchiolite obliterante diffusa e infiltrato peribronchiolare.

Nel decorso cronico il quadro anatomo patologico dei polmoni è sovrapponibile a quello descritto precedentemente con carneificazione e fibrosi. Alla sezione di taglio si nota un cospicuo edema ed enfisema interstiziale. Anche istopatologicamente si repertano bronchite, bronchiolite e bronchiolite obliterante diffuse, flogosi dei setti interstiziali e granulomi epitelioidi. Prevale però la fibrosi dei setti alveolari con iperplasia delle cellule muscolari lisce associata ad iperplasia dell'epitelio alveolare e metaplasia dello stesso. La patogenesi delle alterazioni interstiziali è documentata nella Tabella 2.

Alveolite sclerosante diffusa. Si riscontra nei bovini adulti da carne o da latte, soprattutto in autunno ed inverno. L'eziologia risulta sconosciuta ma è probabile che in alcuni casi sia in rapporto con l'alveolite allergica estrinseca. Anatomo-patologicamente i polmoni sono eccezionalmente pallidi, bianchi, compatti al taglio per diffusi fenomeni fibrotici, di peso notevolmente aumentato (6-14 Kg.). La maggior parte dei lobuli sono bianchi e di consistenza carnosa, quale espressione di fibrosi, ma uno o più lobi possono essere collassati, di colore grigio-rossastro, dai quali fuoriesce abbondante essudato.

I fenomeni di fibrosi intralobulari piuttosto diffusi provocano la

formazione di spazi irregolari, contenenti aria con conseguente alterazione della architettura alveolare. Nella trachea e nei bronchi si osserva grande quantità di muco denso che spesso assume la forma di tappi mucosi.

Istologicamente negli alveoli vi è un grande accumulo di cellule mononucleate alcune delle quali assumono la forma di macrofagi ed altri di pneumociti. La iperplasia dell'epitelio alveolare è altrettanto frequente; la parete alveolare è tapezzata da cellule cubiche oppure da cellule cilindriche ciliate mucipare, per cui gli alveoli spesso sono ripieni di muco. Nella parete dei setti si nota infiltrazione flogistica con plasmacellule, linfociti e cellule interstiziali oltre ad un forte ispessimento per la fibrosi che può portare alla atrofia degli alveoli.

Tra le lesioni agli altri organi è da ricordare il cuore polmonare. La diagnosi differenziale tra l'alveolite sclerosante diffusa e la *Farmer's lung* è molto difficoltosa. Gli autori anglosassoni consigliano di limitare la diagnosi di alveolite sclerosante diffusa ai casi nei quali le lesioni polmonari sono molto gravi e diffuse.

Fog fever. Si tratta di una sindrome respiratoria acuta dei bovini adulti da carne dopo che sono stati spostati su pascoli più lussurreggianti rispetto a quelli sui quali hanno pascolato in precedenza; è più frequente da agosto a novembre.

Sembra che sia causata dall'assunzione di aminoacidi potenzialmente tossici presenti nell' erba, quali L-triptofano o suoi metaboliti quali l'acido indolo-acetico ed il 3, metil-indolo, come è stato sperimentalmente dimostrato.

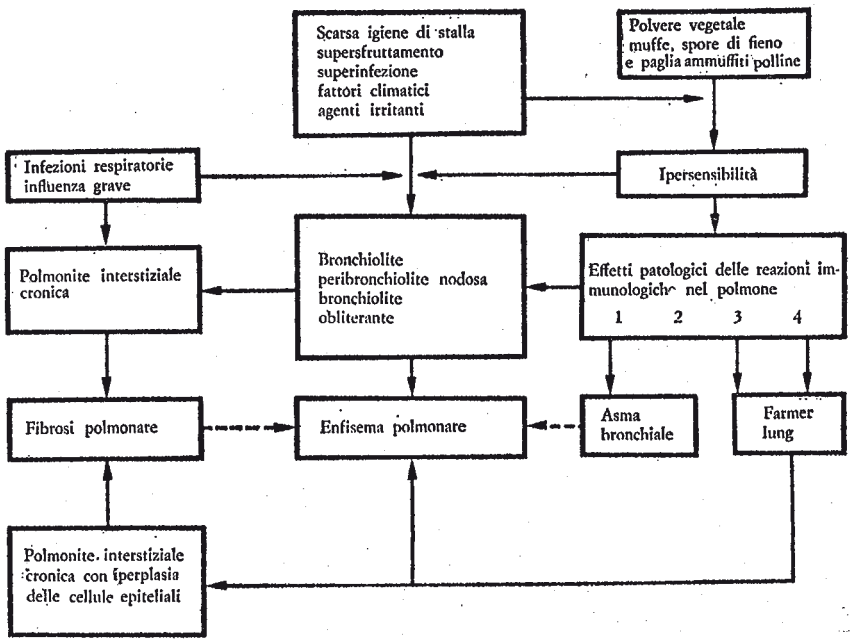
Nei casi letali si osservano congestione ed emorragie nella laringe, nella trachea e nei bronchi. In questi ultimi si reperta pure edema. I lobi anteriori dei polmoni sono di colore rosso cupo, di consistenza gommosa e la superficie di taglio ha un aspetto liscio, lucente e vitreo, per la presenza di congestione, edema e membrane ialine.

Nell'interstizio si nota un *grave enfisema* così come è rilevante *l'edema polmonare* con presenza di liquido giallo gelatinoso soprattutto nella parte ventrale, localizzato nell'interstizio interlobulare e nel connettivo perivascolare. Istologicamente nell'epitelio tracheobronchiale si repertano leucociti globosi ed eosinofili. Gli alveoli ed i bronchioli alveolari sono tapezzati da membrane ialine e contengono granulociti neutrofili ed eosinofili, cellule giganti polinucleate e macrofagi alveolari.

Ovviamente si dovrebbe accennare ad altre malattie respiratorie dei bovini quali la tubercolosi ed altre affezioni specifiche, le infestioni parassitarie nei loro molteplici aspetti, le sindromi da corpo estraneo ecc., sulle quali non ci soffermiamo in quanto ben illustrate e documentate nei classici trattati di anatomia patologica veterinaria.

TABELLA 2

PATOGENESI DELLE AFFEZIONI POLMONARI ALLERGICHE



BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

ALLAN E. M.: Pulmonary bacterial flora of pneumonic and non pneumonic calves in Martin W. B.: Respiratory diseases in cattle. Martinus Nijhoff - The Hague - for the Commission of the European Communities, Boston/ London, 1978.

AUSTWICK P. K. C. (1974) - Clinical and pathological aspects in animals, in de Haller R. e Suter F.: Aspergillosis and Farmer's lung in man and animal. Proceedings of the 4ª International Symposium october 1971, Davos, Huber, Bern, 1974.

BLOOD D. C., HENDERSON J. A. - Veterinary medicine. Balliére Tindall - London, 1974.

BRACA G., CECCARELLI A., ARISPICI M., MANI P. (1979) - Histopathological findings in the respiratory apparatus of calves affected by infectious bovine rhinotracheitis. Observations in field outbreaks. Archivio Vet. Italiano, *30,* 64.

BREEZE R. G. - Fog fever and acute respiratory distress syndromes of cattle. Ph. D. Tesi, Glasgow, 1973.

BREEZE R. G. PIRIE H. M., DAWSON C. O., SELMAN I. E., WISEMAN A. (1975) - The pathology of respiratory diseases of adult cattle in Britain. Folia Vet. Lat., *5,* 95.

BRYSON D. G., McFERRAN J. B., BALL H. J., NEILL S. O. (1979) - Observations on outbreaks of respiratory diseases in calves associated with parainfluenza type 3 virus and respiratory syncytial virus infection. The Vet. Record, *104,* 45.

CANCELLOTTI F. M., CARLOTTO F., CIRELLI L., GUARDA F. - Focolai di malattia respiratoria nel bovino sostenuti da virus respiratorio sinciziale. In corso di stampa sugli Atti della Società Italiana di Buiatria, 1979.

CARLSON J. R., DYER I. A., JOHNSON R. J. (1968) - Tryptophan-induced interstitial pulmonary emphysema in cattle. Am. J. Vet. Res., *29,* 1973.

CARLOS J. R., YOKOYAMA M. T., DICKINSON E. O. (1972) - Induction of pulmonary oedema and emphysema in cattle and goats with 3-methyl indole. Science *176,* 298.

CASARO A. P. E., KENDRICK J. W., KENNEDY P. C. (1971) - Response of the bovine fetus to bovine viral diarrhea mucosal disease virus. Am. J. Vet. Res., *32,* 1543.

CHLADEK D. W. (1975) - Bovine abortion associated with *Haemophilus somnus.* Am. J. Vet. Res., *36,* 1041.

CORREA W. M., CORREA C. N. M., GOTTSCHALK A. F. (1978) - Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale.* Canad. J. Comp. Med., *42,* 227.

DURHAM P. J. K. (1974) - Infectious bovine rhinotracheitis virus and its role in bovine abortion.
N. Zealand Vet. J., *22,* 175.

ENGESTER A.K., JONES L.P. (1974) - Isolation of Chlamydia from an aborted bovine fetus.
The Southwestern Vet., 143.

FANKHAUSER R., LUGINBÜHL H. (1960) - Chronisch-interstitielle Pneumonie mit Adenomatose bei Rindern im Kanton Uri. I. Teil.
Schweiz. Arch. Tierheilk., *102,* 47.

GUARDA F., CANTINI CORTELLEZZI G., CRAVERO G. C. (1974) - Sulla patologia dei feti bovini abortiti.
Clinica Vet., *97,* 97.

GUARDA F., BECCARIA E., CORNAGLIA E. (1976) - Contributo all'anatomia patologica dell'apparato respiratorio dei bovini affetti da rinotracheite infettiva.
Annali Fac. Med. Vet. Torino, *23,* 36.

JELEV V., ANGELOV A., KARADSHOV J. (1971) - Über die Pathomorphologie und die Pathogenese der Streptokokkenaborte bei Kühen.
Zbl. Vet. Med. B., *18,* 610.

JUBB K. V. F., KENNEDY P. C. - Pathology of domestic animals.
Academic Press, New York and London, 1970.

MAGNANI G., BIANCARDI G., GUARDA F., MELLANO F., VECCHI G., FERRARI M. (1978) Aborto bovino da virus IBR - contributo casistico.
Clinica Vet., *101,* 113.

MARCATO P. S. - Anatomia e istologia patologica speciale dei mammiferi domestici.
2ª ediz. Edagricole, Bologna, 1979.

MOHANTY S. B. (1978) - Bovine respiratory viruses. Advances in veterinary science and comparative medicine, *22,* 83.

NEILL S. D., ELLIS W. A., O'BRIEN J. J., CASSELLS J. A. (1978) - Isolation of Neisseria ovis from an aborted bovine foetus.
J. Comp. Path., *88,* 473.

NICOLET J. R., DE HALLER R., SCHOLER H. J. (1969) - La pneumonie de Uri: une pneumonie allergique au fain moisi chez le bovin.
Path. Mikrobiol., *34,* 252.

NIEBERLE K., COHRS P. - Lehrbuch der speziellen Anatomie der Haustiere.
Fischer, Stuttgart, 1970.

PAULI B., LUGINBÜHL H., GERBER H. (1974) - The situation in animals: responses of cattle and horses to inhaled antigens. in de Haller R., Suter F. - Aspergillosis and Farmer's Lung in man and animals.
Proceedings of the 4ª International Symposium october, 1971, Davos, Huber, Bern, 1974.

PEPYS J., JENKINS P. A., FESTENSTEIN G. N., GREGORY P. H., LACEY

M. E., SKINNER F. A. (1963) - Farmer's lung: thermophilic actinomycetes as a source of Farmer's lung hay antigen.
Lancet, *607*.

PIRIE H. M., DAWSON C. O., BREEZE R. G., WISEMAN A., HAMILTON J. (1971) - A bovine disease similar to Farmer's lung: extrinsic allergic alveolitis.
Vet. Rec., *88*, 346.

PIRIE H. M., SELMAN I. E. (1972) - A bovine disease resembling diffuse fibrosing alveolitis.
Proc. roy. Soc. Med., *65*, 987.

PIRIE H. M., BREEZE R. G., ŞELMAN I. E., WISEMAN A (1974) - Fog fever in cattle: pathology. Vet. Rec., *95*, 479.

PIRIE H. M. - Some pulmonary lesions of calves and their significance. in Martin W. B.: Respiratory diseases in cattle. Martinus Nijhoff, The Hague for the Commission of the European Commities, Boston/London, 1978.

ROSENBERGER G. - Krankheiten des Rindes.
Parey, Berlin und Hamburg, 1978.

SCHIFER B. (1974) - Bovine abortion associated with cytomegalovirus infection.
Zhl. Vet. Med., B *21*, 145.

SMITH H. A., JONES T. C., HUNT R. D. - Veterinary pathology.
Lea e Febiger, Philadelphia, 1972.

SWIFT B. L., KENNEDY P. C. (1972) - Experimentally induced infection of in utero bovine fetuses with bovine Parainfluenza 3 virus.
Am. J. Vet. Res., *33*, 57.

VAN DREUMEL A. A., KIERSTEAD M. (1975) - Abortion associated with *Haemophilus somnus* infection in a bovine fetus.
Can. Vet. J., *16*, 367.

WISEMAN A., SELMAN I. E., DAWSON C. O., BREEZE R. G., PIRIE H. M. (1973) - Bovine farmer's lung: a clinical syndrome in a herd of cattle.
Vet. Rec., *93*, 410.

WOHLGEMUTH K., BICKNELL E. J., KIRKBRIDE C. A. (1972) - Abortion in cattle associated with *Bacillus cereus*.
J.A.V.M.A., *161*, 1688.

G. CASTRUCCI

L'IMPIEGO DELLE COLTURE CELLULARI NELLA DIAGNOSI DELLE INFEZIONI RESPIRATORIE DEL BOVINO AD EZIOLOGIA VIRALE

1. *Introduzione*

I virus sono parassiti intracellulari obbligati, incapaci pertanto di sintesi autonome e di replicare in presenza di terreni nutritizi privi di cellule attivamente metabolizzanti. A motivo di ciò la diagnosi eziologica delle malattie virali costituisce una conquista scientifica di tempi relativamente recenti che ha coinciso con la messa a punto di metodiche sempre più appropriate per l'ottenimento di substrati colturali costituiti da cellule proliferanti *in vitro*. Prima dell'avvento delle colture di tessuto notevoli progressi erano già stati realizzati con la coltivazione dei virus su uova embrionate di pollo; tuttavia, sebbene in un certo numero di casi ancora oggi l'embrione di pollo rappresenti il substrato più idoneo, le colture cellulari detengono ormai il primato come mezzo d'indagine sui vari aspetti, sia scientifici che applicativi, riguardanti la scienza virologica.

2. *Colture cellulari*

I primi tentativi per la coltivazione di cellule *in vitro* risalgono all'inizio del secolo, ciò nondimeno le colture cellulari sono entrate in una fase di pratica realizzazione solo alcuni decenni più tardi, con l'avvento cioè degli antibiotici. Le precauzioni in materia di antisepsi sono ancora oggi necessarie, tuttavia le contaminazioni sostenute da eubatteri, micoplasmi, funghi e lieviti, non rappresentano più al momento attuale un ostacolo insormontabile come invece lo era in passato.

A partire dal 1949, fin da quanto cioè è stata realizzata la coltivazione del virus poliomielitico in cellule proliferanti *in vitro* con

conseguente comparsa di alterazioni a carico del substrato di coltura, l'elenco degli agenti virali per i quali è possibile la coltivazione in condizioni analoghe si è accresciuto rapidamente tanto che è stato possibile addivenire all'isolamento e relativa identificazione di alcune centinaia di virus prima sconosciuti.

La scoperta degli *adenovirus*, dei virus ECHO, come pure dei *coronavirus* e *rhinovirus* è infatti da attribuire all'impiego delle colture cellulari. A quest'ultime sono pure da riferire oltre ai già citati progressi in sede diagnostica, quelli relativi alla preparazione di vaccini verso numerose condizioni morbose dell'uomo e degli animali, nonché le recenti acquisizioni in tema di biologia molecolare dei virus dei vertebrati.

Senza volere entrare nel merito delle varie fasi che hanno cronologicamente caratterizzato la evoluzione delle metodiche di allestimento dei substrati colturali, torna invece opportuno ricordare, per gli scopi specifici cui questa breve sintesi si riferisce, che esistono tre principali tipi di colture. Appartengono al primo tipo colture le cui cellule sono in grado di compiere soltanto alcuni cicli replicativi *in vitro* prima di esaurirsi (*colture primarie*); quelle del secondo tipo sono costituite da cellule in grado di compiere fino a circa cento cicli di replicazione (*stipiti diploidi*); il terzo tipo, infine, è rappresentato da colture il cui potenziale replicativo può essere considerato inesauribile (*linee cellulari in coltura continua*).

2.1. *Colture primarie* - Si ottengono da cellule provenienti direttamente dall'organo dell'animale. La coltura risulta costituita da elementi cellulari di vario tipo, in grado di compiere 5-10 cicli replicativi *in vitro*. Lo spettro di recettività nei confronti degli agenti virali offerto dalle colture primarie è piuttosto ampio ed il loro impiego in sede diagnostica è molto diffuso.

2.2. *Stipiti cellulari diploidi* - Sono rappresentati da colture di un solo tipo di cellule, capaci di effettuare un centinaio di cicli replicativi. La caratteristica peculiare di queste cellule è quella di conservare il numero diploide di cromosomi della specie animale di origine durante tutta la loro permanenza in coltura.

Gli stipiti diploidi trovano un largo impiego nella diagnosi delle malattie da virus oltre che nel campo della produzione dei vaccini ed in quello della ricerca di base. Il loro uso è particolarmente indicato

per la coltivazione di determinati virus il cui genoma è in grado di esprimersi solo in cellule in cui l'originale stato di differenziazione non subisce variazioni nel corso dei passaggi *in vitro*.

2.3. *Linee cellulari in coltura continua* - Le colture hanno origine da un solo tipo di cellule capaci di propagare indefinitamente *in vitro*. Le linee cellulari generalmente derivano da tumori o da cellule diploidi «trasformate» e molto spesso non presentano nessuna correlazione con gli elementi cellulari da cui hanno preso origine, a motivo delle numerose mutazioni subite nel corso delle varie fasi che ne hanno caratterizzato il loro adattamento in coltura continua. Più precisamente, si tratta di cellule che hanno perduto le caratteristiche morfologiche e biochimiche originali, che possedevano cioè allo stato di cellule differenziate *in vivo*. Infatti non è possibile accertare differenze di sorta fra le varie linee cellulari di provenienza ectodermica o endodermica, o nell'ambito di linee costituite da elementi cellulari di tipo fibroblastico di origine mesodermica. Le linee cellulari hanno spesso un numero aneuploide (maggiore o minore del numero diploide normale) di cromosomi e possono avere caratteri di malignità.

Il vantaggio offerto dalle linee cellulari in coltura continua rispetto alle colture primarie è costituito dal fatto che esse possono essere propagate indefinitamente sottoponendo le cellule a passaggi seriali ad intervalli regolari di tempo. Le cellule inoltre rimangono vitali per molti anni se conservate in presenza di dimetil-sulfossido a — 70° C (CO_2 solida) o, meglio ancora a — 196° C (azoto liquido).

3. *Scelta del substrato*

Per l'isolamento del virus la scelta del substrato cellulare costituisce un'operazione di capitale importanza. In linea di principio si ammette che il virus manifesti, nei saggi di coltivazione *in vitro*, lo stesso spettro di ospite-patogenicità che lo contraddistingue nella infezione *in vivo*. Nel caso specifico sarà data pertanto la preferenza a colture di cellule di provenienza bovina.

Nei riguardi del tipo di cellule da impiegare, la scelta dovrà essere fatta nell'ambito dei tre tipi citati. Fra le linee cellulari in coltura continua allestite da organi provenienti dalla specie bovina, tre

risultano le più diffuse nei vari laboratori di virologia, e precisamente una, EBTr, derivante da cellule della mucosa tracheale di feto e le altre due, contraddistinte con le sigle AUBEK e MDBK, allestite da rene, rispettivamente, di feto bovino e di vitello. Ai fini dell'isolamento del virus da materiale patologico, tuttavia le cellule in coltura continua appaiono le meno indicate allo scopo e ciò per due motivi. In primo luogo, per le ragioni già indicate, secondo le quali tali cellule avrebbero perduto le proprietà tipiche della specie di origine, esse presenterebbero uno spettro di sensibilità alquanto variabile nei confronti dei vari agenti virali. In secondo luogo, molto frequentemente le linee cellulari in genere risultano contaminate da forme «L» dei batteri e, ancora più spesso, da micoplasmi.

Le colture primarie, in quanto costituite da tipi diversi di cellule differenziate, presentano un ampio spettro di sensibilità e, specialmente quelle allestite da organi di feto, come rene, polmone e testicolo, che nella specie bovina risulterebbero esenti da anticorpi verso i vari virus, apparirebbero le più idonee per essere impiegate nella diagnosi eziologica delle infezioni virali del bovino. Anche in questo caso tuttavia è necessario fare alcune riserve. Infatti, l'età del feto costituisce un elemento importante nel senso che tanto più è giovane il soggetto che ha fornito l'organo da coltivare, tanto più variabile risulterà la sensibilità della coltura. Allo scopo è consigliabile utilizzare organi di feti in età avanzata e comunque non inferiore a 6 mesi: in questa maniera verrebbe notevolmente ridotto il rischio a cui si è fatto cenno.

Una seconda riserva si riferisce al costante pericolo che la coltura primaria sia portatrice di virus allo stato latente. Fra i virus del bovino che più comunemente vengono veicolati in dette condizioni sono da ricordare principalmente quello della diarrea virale del bovino (BVD) ed il virus respiratorio sinciziale (RS). L'inconveniente non è facilmente superabile ed anzi molto spesso esso crea dei problemi nella interpretazione dei risultati rendendo poco attendibile o comunque dubbio l'esito delle prove eseguite ai fini della diagnosi.

Il substrato ideale per l'isolamento del virus è indubbiamente costituito dagli stipiti di cellule diploidi, ottenuti da organi fetali di bovino ed impiegati intorno al 14° passaggio, quando cioè il loro adattamento *in vitro* è da considerare ormai stabilizzato. L'uso delle colture sarà preceduto da adeguati controlli relativi alla eventuale

presenza di virus allo stato latente e allo spettro di sensibilità nei confronti dei diversi agenti virali del bovino.

4. *Accertamento della replicazione del virus in coltura*

Lo sviluppo dei virus in generale in cellule proliferanti *in vitro,* può essere apprezzato mediante diversi procedimenti biochimici che consentono la visualizzazione, nell'ambito della cellula, delle sintesi macromolecolari virus-indotte che portano alla formazione dei virioni. Esistono tuttavia dei metodi più semplici che consentono di accertare la presenza del virus e la cui utilizzazione costituisce una normale «routine» per l'attività diagnostica oltre che a rappresentare un ausilio di notevole importanza nel campo della ricerca. Tali metodi consistono nell'apprezzamento dell'effetto citopatico, nella evidenziazione dell'emadsorbimento e nelle prove di interferenza.

4.1. *Effetto citopatico* - Diversi agenti virali, ma assolutamente non tutti, uccidono la cellula in cui replicano, cosicché a carico del substrato infetto è possibile osservare l'insorgenza di alterazioni che si manifestano in maniera sempre più evidente con il progredire dell'infezione e con la formazione di nuovi virioni. Tali alterazioni vengono indicate con la espressione generica di «effetto citopatico» (ECP) mentre al virus responsabile viene attribuito l'aggettivo di «citopatico» o «citopatogeno». Nella maggioranza dei casi l'ECP è apprezzabile mediante il semplice esame «a fresco» condotto al microscopio ottico a piccolo ingrandimento (40-80 x). Un osservatore esperto è in grado di distinguere i vari tipi di ECP le cui caratteristiche, riferite ai diversi virus, sono riportate nella Tabella 1.

TABELLA 1 — Effetto citopatico da virus diversi in colture cellulari.

ECP	VIRUS
Picnosi, raggrinzimento e necrosi cellulare	Enterovirus, poxvirus, reovirus, togavirus, rhinovirus
Formazione di aggregati di cellule rotondeggianti	Adenovirus
Fusione cellulare (sincizi)	Paramyxovirus, virus erpetici
Alterazioni lievi e non ben definite	Orthomyxovirus, rhabdovirus, coronavirus, retrovirus, arenavirus

Tuttavia, un esame più accurato delle alterazioni, per la evidenziazione cioè di particolari significativi, come ad esempio la formazione di inclusi cellulari e di sincizi, esige il fissaggio e la colorazione delle colture infette. Il fissaggio più usato è il liquido di Bouin mentre il metodo di colorazione è quello che prevede l'impiego della ematossilina e dell'eosina.

L'osservazione dell'ECP costituisce un elemento importante nella diagnosi virologica connessa con l'isolamento del virus dall'animale infetto. Alcuni virus replicano già al primo passaggio in coltura e la comparsa dell'ECP è tanto più precoce quanto maggiore è la concentrazione dei virioni infettanti contenuti nell'inoculo e soprattutto quanto più breve è il periodo di latenza del virus in esame. Infatti, nel caso degli enterovirus e dei virus erpetici, il cui ciclo di replicazione è caratterizzato da una latenza di breve durata e da una resa in virioni neoformati piuttosto elevata, l'ECP si rende evidente nel giro di 24-48 ore dall'inoculazione delle colture e la distruzione del substrato è già completa in tre giorni. D'altra parte, i citomegalovirus, il virus respiratorio sinciziale e gran parte degli adenovirus, essendo tutti caratterizzati da un lento ciclo di sviluppo, inducono ECP in un tempo considerevolmente più lungo, talvolta computabile in alcune settimane. In questi casi, dovendo protrarre l'osservazione delle colture inoculate per un tempo piuttosto lungo, la valutazione dell'ECP diviene problematica, non essendo sempre possibile differenziare le alterazioni aspecifiche del substrato causate dall'età avanzata della coltura, da eventuali modificazioni virus-indotte. Per ovviare a tale inconveniente vengono eseguiti passaggi seriali, cosiddetti «ciechi», del materiale in esame e ciò con il duplice scopo, da un lato, di ottenere un aumento del titolo del virus eventualmente presente, e dall'altro, di favorire la selezione di varianti del virus più facilmente adattabili a sviluppare *in vitro*.

4.2. *Emadsorbimento* - Le cellule di coltura, previamente infettate con orthomyxovirus, paramyxovirus o togavirus, con virus cioè che coinvolgono in maniera più o meno significativa la membrana della cellula nel corso del processo di maturazione, acquisiscono la proprietà di adsorbire le emazie. Il fenomeno viene indicato con il termine di «emadsorbimento» ed è dovuto alla integrazione da parte della membrana cellulare di proteine virus-indotte aventi siti speci-

fici per l'adsorbimento delle emazie.

Questa prerogativa acquisita dalla cellula infetta viene utilizzata per accertare la presenza di agenti virali non citopatici come pure per la evidenziazione precoce di un virus citopatico.

4.3. *Interferenza* - La infezione della cellula con un virus può prevenire la replicazione di un secondo virus che successivamente compete per la stessa cellula. Questo fenomeno, che è conosciuto con il termine di «interferenza», può verificarsi secondo meccanismi diversi, e precisamente: a. il virus interferente occupa e denatura i recettori cellulari i quali non sarebbero quindi più disponibili per un secondo virus se quest'ultimo, essendo correlato al primo, necessitasse dello stesso tipo di recettori per l'adsorbimento; b. il virus interferente utilizza determinati enzimi della cellula, ad esempio la RNA-polimerasi, privando così il secondo virus di un enzima essenziale per la sua replicazione; l'interferon, una glicoproteina virus-indotta, codificata dalla cellula, può essere considerata un bioprodotto della interazione virus-cellula; questo prodotto rappresenta probabilmente il mediatore più importante dell'interferenza virale. L'interferon infatti, una volta indotto dal primo virus infettante, agisce nei confronti del virus superinfettante inibendone la replicazione.

Il fenomeno viene utilmente sfruttato nella routine diagnostica per la evidenziazione di virus non citopatici.

5. *Particolari aspetti delle alterazioni cellulari virus-indotte*

L'evento terminale della interazione fra un virus citopatico ed una cellula recettiva è di solito rappresentato dalla morte della cellula che, a sua volta, presenta alterazioni spesso abbastanza significative da un punto di vista diagnostico. Fra le alterazioni più comunemente osservate si ricordano quelle derivanti dalla *inibizione delle sintesi macromolecolari, l'effetto citopatico indotto dalle proteine del virus, l'alterato comportamento degli enzimi lisosomiali, la formazione di inclusi cellulari, le modificazioni a carico della membrana cellulare* e *gli effetti sulla mitosi.*

5.1. *Inibizione delle sintesi macromolecolari* - Numerosi virus citopatici codificano le proteine precoci inibendo di conseguenza la sintesi di RNA e delle proteine cellulari mentre solo più tardi in-

terferiscono con la sintesi del DNA. Tali effetti inibenti sono particolarmente rapidi e drastici nelle infezioni da picornavirus, alcuni poxvirus e virus erpetici, che notoriamente sono dotati della capacità di indurre un effetto citopatico molto manifesto e piuttosto precoce. Gli stessi effetti risultano invece più lenti e meno accentuati se la infezione è sostenuta da virus scarsamente citopatici, o addirittura nulli nel caso di virus non citopatici, come i retrovirus, che non distruggono la cellula.

5.2. *Effetto citopatico indotto dalle proteine virali* - Le proteine capsidiche del virus, a concentrazioni elevate, risultano spesso tossiche per le cellule animali e possono costituire la causa principale dell'ECP.

Il fenomeno consegue all'accumulo delle proteine virus-indotte in una fase tardiva della replicazione se l'inoculo della coltura è stato eseguito con un numero ridotto di unità infettanti o, viceversa, esso può manifestarsi piuttosto precocemente nel caso di un inoculo altamente concentrato. L'esempio più dimostrativo in merito è fornito dagli adenovirus che, a livello di struttura capsidica presentano due antigeni in grado di indurre ECP. L'uno, antigene pentonico, induce la formazione di focolai costituiti da ammassi di elementi rotondeggianti con conseguente distacco delle cellule dal supporto di coltura; l'altro, antigene delle fibre, inibisce le sintesi macromolecolari della cellula (DNA, RNA e proteine) rendendo quest'ultima resistente alla replicazione degli stessi adenovirus oltre che di altri virus. Questo tipo di inibizione delle sintesi cellulari, a cui consegue il blocco dell'attività replicativa del virus, è un fenomeno nettamente distinto da quello citato in precedenza (5.1) in cui le proteine precoci, virus-indotte, inibiscono in maniera specifica le sintesi macromolecolari della cellula, mentre il ciclo replicativo del virus continua regolarmente.

5.3. *Comportamento degli enzimi lisosomiali* - L'attivazione degli enzimi lisosomiali può costituire, in talune interazioni virus-cellula, uno dei meccanismi più importanti mediante i quali i virus inducono determinate alterazioni cellulari.

L'attivazione di detti enzimi si verifica, nella cellula infetta, attraverso tre fasi; in una fase precoce dell'infezione le membrane del-

le vescicole lisosomiali divengono più permeabili senza tuttavia consentire il passaggio degli enzimi all'esterno. A questo stadio il fenomeno è reversibile. Successivamente, aumentando la permeabilità della membrana, gli enzimi lisosomiali diffondono nel citoplasma e, eventualmente, penetrano anche nel nucleo. Come conseguenza la cellula assume una forma rotondeggiante. La terza fase è contraddistinta dalla generalizzazione del fenomeno con la diffusione degli enzimi a tutta la cellula che viene infine distrutta per effetto dell'autolisi indotta dagli stessi enzimi.

Nel caso di virus non citolitici le alterazioni lisosomiali non vanno oltre la prima fase. Il fenomeno può essere evidenziato mediante il trattamento delle cellule infette con rosso neutro. Infatti i lisosomi, in una fase precoce dell'infezione, assumono più rosso neutro di quanto non facciano in condizioni normali, di conseguenza i focolai d'infezione si manifestano nel substrato sottoforma di placche colorate intensamente in rosso.

Nel caso di virus citolitici il processo di attivazione raggiunge la seconda fase. La cellula in queste condizioni non assume affatto il rosso neutro ed i focolai d'infezione si appalesano con placche incolori.

5.4. *Inclusi cellulari* - L'alterazione più caratteristica evidenziabile in una cellula sottoposta ad infezione virale è rappresentata dal cosiddetto «corpo incluso» o inclusione cellulare, identificabile con una regione della cellula nella quale risulta alterata la normale affinità tintoriale.

A seconda del virus infettante, l'incluso può essere singolo o multiplo, piccolo o grande, rotondeggiante o di forma irregolare, intracitoplasmatico o intranucleare, acidofilo o basofilo. La loro comparsa è in rapporto al progredire dell'infezione e, generalmente, essi costituiscono le sedi o i «focolai» in cui vengono sintetizzati gli acidi nucleici virali e relative proteine o dove avvengono i processi di assemblaggio dei virioni.

Le inclusioni più note sono quelle evidenziabili in sede citoplasmatica di cellule infettate con poxvirus, paramyxovirus, reovirus e rhabdovirus, e quelle indotte in sede nucleare da parte di virus erpetici e di adenovirus (Tabella 2).

Attraverso la immunofluorescenza è stato provato che in molti casi gli inclusi si identificano con le sedi delle sintesi virali, mentre in altri, come nel caso degli inclusi nucleari da virus erpetici, essi costituiscono l'esito finale della replicazione del virus.

TABELLA 2 — Inclusi cellulari.

Sede	Affinità tintoriale	Virus *
Nucleare	Basofili	Adenovirus
Nucleare	Acidofili **	Herpesvirus
Citoplasmatica	Acidofili	Paramyxovirus
		Reovirus
		Rhabdovirus
		Poxvirus
		(Togavirus)
Nucleare e citoplasm.	Acidofili	Morbillo
		Peste bovina
		(Orthomyxovirus)
		Cytomegalovirus

* Fra parentesi sono indicati virus la cui capacità ad indurre la formazione di inclusi è in dipendenza del substrato colturale impiegato.
** Occasionalmente basofili.

5.5. *Modificazioni a carico della membrana cellulare* - Tutti i virus citopatici e molti virus non citopatici inducono alterazioni a carico della membrana cellulare, rappresentate dalla formazione di sincizi o dalla comparsa di nuovi antigeni a carico della superficie della cellula.

5.5.1. *Formazione di sincizi* - I paramyxovirus, sia attivi che inattivi mediante trattamento con raggi ultravioletti, possono indurre, se inoculati a concentrazioni elevate, la fusione degli elementi cellulari della coltura causando così la formazione di policariociti, o sincizi, precoci. Gli stessi virus, in condizioni normali di coltura, impiegati cioè ad inoculi moderatamente concentrati, inducono ugualmente la formazione di sincizi, ma il fenomeno si verifica in una fase avanzata del ciclo di replicazione. I sincizi, o cellule giganti, costituiscono un aspetto peculiare di determinate infezioni sostenute

oltre che dai paramyxovirus in genere, anche da alcuni virus erpetici (pseudorabbia, *Bovin herpesvirus 2, Herpes simplex,* ecc.).

5.5.2. *Comparsa di nuovi antigeni* - Nuovi antigeni, indotti dal genoma virale, possono comparire a carico della membrana citoplasmatica della cellula infetta. L'esempio più classico è quello fornito dalle cellule infettate con virus muniti di envelope (es. virus influenzale) nelle quali si osserva la integrazione della agglutinina virale a livello delle corrispondenti membrane plasmatiche, tanto che queste assumono la proprietà di adsorbire le emazie. Tali antigeni virus-indotti costituiscono un bersaglio per l'apparato immunoprotettivo dell'organismo: ad essi infatti si legano gli anticorpi citotossici che con l'ausilio dei linfocti «T» inducono la distruzione della cellula infetta avviando così il processo di guarigione. In altri casi, al contrario, la reazione immunitaria che ne segue costituisce l'origine della malattia che, in seguito a tali fenomeni, si manifesta clinicamente.

La formazione di nuovi antigeni a carico della membrana della cellula è inoltre osservabile nei casi d'infezioni sostenute da virus oncogeni che operano la trasformazione della cellula stessa.

5.6. *Effetti sulla mitosi* - Nelle infezioni latenti sostenute da virus non citolitici, la sintesi delle macromolecole come pure la divisione della cellula di solito non risultano influenzate dalla presenza del virus. Viceversa, nelle infezioni da virus altamente citopatici (alcuni picornavirus e i virus erpetici) le sintesi della cellula vengono bloccate in maniera drastica e ne viene inibita anche la divisione. Se tuttavia la infezione si verificasse in una fase avanzata del ciclo cellulare, comunque troppo tardi per bloccare la mitosi, allora le sintesi cellulari continuano regolarmente e la replicazione del virus risulterà ritardata per tutto il tempo di durata della mitosi. In situazioni intermedie rispetto ai due casi citati, la mitosi può procedere in maniera aberrante.

6. *Considerazioni conclusive*

Le informazioni fornite nei capitoli che precedono rappresentano, seppure in forma piuttosto concisa, le premesse essenziali per la utilizzazione delle colture di tessuto allo scopo di una diagnosi eziolo-

gica delle malattie da virus in generale. Facendo ora un riferimento particolare alle infezioni respiratorie del bovino sostenute da agenti virali, il compito assume dimensioni più limitate senza tuttavia cambiare nella sua essenza e ciò per due motivi.

In primo luogo, mentre per alcuni virus, come quello della rinotracheite infettiva del bovino, il virus *Parainfluenza-3,* il virus respiratorio sinciziale e gli adenovirus, è ormai nota la loro patogenicità per l'apparato respiratorio, per altri, o la loro azione per l'apparato respiratorio del bovino non risulta del tutto provata o comunque appare ancora piuttosto dubbia (virus BVD e reovirus). D'altra parte altri virus fino ad ora non considerati agenti di sindromi respiratorie nel bovino (coronavirus), potrebbero invece esserlo, in considerazione del fatto che in altre specie animali la loro associazione a malattie respiratorie è stata da tempo provata.

Il secondo motivo che non giustifica una trattazione speciale per i virus «respiratori» del bovino, riposa sul concetto che nel caso specifico di una diagnosi eziologica di una malattia virale, la scelta del substrato cellulare deve essere operata in una tale maniera da porsi nelle migliori condizioni per addivenire all'isolamento dell'agente virale eventualmente presente nel materiale patologico e ciò, a prescindere dalla famiglia di appartenenza o dal presunto tropismo del virus per i vari apparati dell'organismo parassitato.

Ciò premesso tutto quanto è stato suggerito a proposito della scelta del substrato cellulare e dei criteri da seguire per l'accertamento del virus è da ritenere valido anche per i virus respiratori del bovino.

S'intende che per dimostrare la identità del virus isolato saranno necessarie ulteriori prove tendenti allo studio delle proprietà fisico-chimiche e biologiche del virus oltre che all'accertamento della sua struttura antigene.

C. F. FLAMMINI *, E. BOTTARELLI *, G. ALLEGRI *, F. DE SIMONE ** e A. CIVARDI **

RICERCA DI ANTIGENI VIRALI MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

* Istituto Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria Università di Parma.
** Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Brescia.

Premessa

Le infezioni respiratorie del bovino risultano associate a virus e batteri, i quali possono interagire fra di loro dando luogo a sindromi ad eziologia multipla, caratterizzate dalla comparsa di sintomi e lesioni anatomo-patologiche che spesso non consentono di formulare una diagnosi precisa e, pertanto, in molti casi, una diagnosi eziologica può essere conseguita solo facendo ricorso agli esami di laboratorio.

Il metodo classico per la diagnosi delle infezioni virali prevede l'isolamento e l'identificazione dell'agente causale e la dimostrazione dell'incremento del titolo degli anticorpi specifici. In particolare, per quanto riguarda l'individuazione degli agenti virali, il procedimento ora ricordato è risultato, nella pratica di laboratorio, indaginoso, lento e, talvolta, aleatorio, con la conseguenza che la diagnosi eziologica delle virosi rimane spesso indeterminata. Tutto ciò ha imposto, da un lato, l'adozione di nuovi parametri diagnostici che prescindono, almeno in parte, dal rispetto dei postulati di Koch e, dall'altro, l'impiego e la messa a punto di metodiche di laboratorio che consentono la dimostrazione del virus in causa senza far ricorso all'isolamento e alla successiva identificazione. Queste tecniche, però, devono possedere alcuni requisiti preliminari. Il primo è rappresentato dalla applicabilità presso laboratori non necessariamente provvisti di quelle complesse strutture che sono tipiche dei centri di virologia. Il se-

condo riguarda l'applicabilità delle metodiche e degli strumenti di accertamento diagnostico, espressa come capacità a fornire il minor numero possibile di responsi «falsi negativi» o «falsi positivi». Il terzo si riferisce all'esigenza di ottenere il responso diagnostico in tempi brevi. Il quarto concerne la necessità di predisporre materiali e metodiche il più possibile standardizzate al fine di ottenere risultati univoci ed oggettivi anche operando in laboratori diversi.

La tecnica degli anticorpi fluorescenti o immunofluorescenza (IF) sembra soddisfare alle esigenze ora menzionate (OMS, Memorandum 1977). Questa metodica è stata applicata in numerosi settori della ricerca biomedica sia per evidenziare e identificare una vasta gamma di antigeni che per accertare la presenza di anticorpi specifici (Gardner e McQuillin, 1974; Kawamura, 1977). Tuttavia, l'IF ha trovato più ampio impiego nella diagnostica delle infezioni virali, rappresentando uno dei pochi mezzi di laboratorio che consente di localizzare visibilmente e identificare a livello cellulare non solo particelle virali presenti in numero modesto, ancor prima che esse provochino effetto citopatico (ECP), ma anche virus sprovvisti di questa caratteristica, virus particolarmente labili o difficili da coltivare su monostrato cellulare (Wellemans e coll., 1979).

Principio e metodi dell'immunofluorescenza

Il principio dell'IF consiste nel fissare sull'anticorpo un fluorocromo onde rilevarne la presenza con la microscopia a fluorescenza. Poiché l'anticorpo chimicamente legato ad alcuni reattivi fluorescenti, generalmente Fluoresceina Isotiocianato (FITC) o Rodamina B (RB 200), conserva inalterata la capacità di combinarsi con l'antigene omologo, la specificità della reazione antigene-anticorpo consente di evidenziare una vasta gamma di antigeni.

Dopo la scoperta di Coons e coll. (1942) e di Coons e Kaplan (1950), i quali dimostrarono che un anticorpo marcato con fluoresceina era capace di evidenziare il corrispondente antigene presente nei tessuti, sono stati ideati numerosi metodi in grado di evidenziare antigeni virali direttamente nei materiali organici (feci, secrezioni, sezioni di organo), sia nei monostrati cellulari inoculati con materiale sospetto. Nella diagnostica sperimentale vengono utilizzati più frequentemente il metodo diretto (IFD) e il metodo indiretto (IFI).

Nel metodo diretto il fluorocromo viene legato all'anticorpo e quindi si fissa laddove è presente l'antigene omologo impartendogli una fluorescenza caratteristica quando il preparato viene illuminato con luce ultravioletta. La specificità del metodo è buona ma esso richiede la disponibilità di numerosi antisieri coniugati con fluorocromo.

Questo inconveniente può essere evitato coll'IFI, che impiega un fluorocromo fissato su un anticorpo che viene utilizzato per evidenziare non più un antigene batterico o virale ma le immunoglobuline di una determinata specie animale. In genere, l'anticorpo marcato con fluorocromo si prepara iniettando a un montone immunoglobuline di coniglio ed esso servirà per tutti i sistemi che utilizzano antisieri di coniglio. Tale metodo rispetto al precedente è 5-10 volte più sensibile, in quanto nel primo stadio della reazione antigene-anticorpo non marcato si determina la condizione che consentirà a molti anticorpi fluorescenti di legarsi a un singolo anticorpo combinato con l'antigene omologo. Ciò crea un'area più estesa di fluorescenza che risulterà perciò più intensa e consentirà di evidenziare antigeni presenti anche in concentrazione minima.

Prelievo e preparazione dei campioni

Nella diagnostica delle infezioni respiratorie del bovino la scelta del materiale da esaminare, il momento del prelievo in rapporto alla evoluzione dell'infezione e la tecnica di preparazione del campione per l'osservazione mediante IF rivestono una grande importanza ai fini dell'attendibilità dei risultati.

I campioni devono essere prelevati dagli organi sede d'infezione e debbono contenere un numero elevato di cellule integre. L'evidenziazione di una fluorescenza distribuita in maniera caratteristica all'interno di esse, a confronto con la completa assenza di aree fluorescenti nel materiale di controllo, costituisce il principale criterio per la formulazione di una diagnosi attendibile, la quale potrà essere confermata successivamente dall'isolamento del virus mediante i metodi classici oppure dai risultati delle prove sierologiche. I frammenti cellulari o i materiali extra-cellulari, sebbene possano fornire una fluorescenza specifica per la presenza di antigeni virali, molto spesso presentano una fluorescenza aspecifica. Quando è possibile, i materiali contenenti cellule infiammatorie, frammenti di cellule o muco-

polisaccaridi devono essere sottoposti a lavaggi durante il procedimento di preparazione, per allontanare possibili cause di fluorescenza aspecifica o di interferenza nella reazione antigene-anticorpo.

Le infezioni respiratorie del bovino si associano frequentemente alla comparsa di secrezioni patologiche nelle prime vie e, talvolta, del tratto genitale. Questo materiale, ricco di cellule provenienti dai tessuti colpiti, può essere prelevato dall'animale in vita in uno stadio precoce della malattia ed utilizzato per l'accertamento diagnostico. L'IF su questi campioni fornisce risultati migliori rispetto ai materiali prelevati post-mortem da altri organi.

Baskerville e Lloyd (1977) hanno messo a punto una metodica che consente di prelevare per aspirazione cellule epiteliali e secrezioni dal naso, faringe, tratto genitale e da altre sedi di diverse specie animali. Questa tecnica applicata nell'ambito della diagnostica delle infezioni respiratorie del bovino ha consentito di ottenere campioni ricchi di cellule epiteliali anche quando la secrezione nell'animale era scarsa, favorendo l'interpretazione dei risultati dell'IF. Il materiale ottenuto sembra possedere i requisiti essenziali per la ricerca dei virus Parainfluenza 3 (PI 3), Rinotracheite Infettiva (IBR), Adenovirus (BVA) e Virus Respiratorio Sinciziale (VRS).

In condizioni ottimali i campioni provenienti dalle prime vie dell'apparato respiratorio dovrebbero essere esaminati entro 24 ore dal prelievo oppure conservati a +4° C per evitare che la temperatura e l'essiccamento possano provocare gravi alterazioni a carico delle cellule. Una volta fissati su vetrino con acetone essi possono essere conservati in congelatore indefinitamente.

Nella pratica diagnostica è opportuno conservare sempre una aliquota di materiale patologico per ulteriori prove diagnostiche volte all'isolamento di virus eventualmente presenti.

Per i prelievi effettuati post-mortem sono da preferire: le secrezioni tracheali e bronchiali ed il polmone. Essi vanno eseguiti entro poche ore dalla morte o dall'abbattimento dell'animale e il materiale, raccolto in recipienti sterili e conservato a +4° C, deve essere inviato al più presto al laboratorio.

I risultati più attendibili nella diagnostica delle infezioni respiratorie si registrano con i campioni prelevati nella fase iniziale dell'infezione.

Per quanto riguarda l'allestimento dei preparati esiste in lettera-

tura una varietà di metodi sufficientemente collaudati, che consentono di evitare la comparsa di autofluorescenza e fenomeni di estrazione e diffusione dell'antigene (Pillot 1972; Gardner e McQuillin, 1974, Kawamura, 1977).

Reagenti e controlli di specificità

In generale l'IF viene applicata alla diagnosi delle infezioni virali impiegando reagenti allestiti nei singoli laboratori e solo raramente prodotti del commercio. Questi non sempre sono reperibili e anche quando lo sono devono essere preliminarmente controllati per verificarne le possibilità di utilizzazione nelle singole condizioni sperimentali (Daisy e coll., 1979). L'impossibilità di un regolare approvvigionamento di sieri coniugati e standardizzati costituisce ancora oggi il motivo principale che ostacola la diffusione su larga scala dell'IF nella diagnostica sperimentale.

La qualità degli antisieri destinati a scopo diagnostico riveste fondamentale importanza proprio nel caso delle infezioni da virus e si giustificano quindi gli accorgimenti volti ad ottenere il più alto grado di specificità. Questa può essere negativamente influenzata dalla esigenza di coltivare gli antigeni su substrati viventi e dalla stretta associazione fra i virus ed i corrispondenti substrati colturali. Quest'ultima evenienza rende quasi impossibile l'ottenimento di antisieri che non reagiscano anche con i costituenti antigeni impiegati per la coltura dei virus.

È inoltre possibile che il substrato cellulare utilizzato contenga dei contaminanti il cui allontanamento è indispensabile se si vuole che essi non inducano la comparsa di anticorpi non desiderati. Qualora presenti nell'antisiero da coniugare con fluorocromo, essi possono essere allontanati mediante adsorbimento *con lo stesso substrato cellulare* utilizzato per la preparazione dell'antigene.

È infine da preferire che quest'ultimo venga sottoposto a procedimenti che ne consentano la purificazione e la concentrazione. A tale scopo si suggerisce l'impiego di una matrice virale costituita da uno stipite di referenza e provvisto di un alto titolo nei confronti del substrato prescelto. Tale caratteristica viene generalmente acquisita attraverso l'esecuzione di alcuni passaggi in serie sullo stesso substrato cellulare che verrà utilizzato per la produzione della matrice vira-

le. La purificazione, intesa come procedimento volto ad allontanare gli antigeni non virionici, si ottiene in genere mediante precipitazione e centrifugazione.

Per la preparazione di antisiero, gli animali di scelta sono costituiti da coniglio, pecora, capra e cavia che vengono sottoposti a procedimenti diversi di immunizzazione. In generale, questa ha lo scopo di determinare un elevato titolo di anticorpi nel più breve tempo possibile, in modo di evitare la comparsa di anticorpi verso antigeni non virionici oppure verso agenti potenzialmente capaci di provocare infezione spontanea negli animali da esperimento.

L'inoculazione, intradermica o sottocutanea, di antigene virale addizionato con adiuvante di Freund consente di ottenere antisieri ad alto titolo. In questi casi il materiale deve essere distribuito in piccole aliquote ed inoculato in punti diversi poiché, in caso contrario, potrebbe determinare la comparsa di infezioni locali prevalentemente di natura batterica.

Il controllo di specificità dell'antisiero da coniugare viene, in prima istanza, ottenuto mediante confronto con il siero dello stesso animale (presiero), prelevato prima dell'inizio del processo di immunizzazione. Tale raffronto serve anche a verificare l'esistenza, negli animali da immunizzare, di anticorpi verso l'antigene che verrà successivamente inoculato e che potrebbero interferire con le reazioni immunitarie indotte dallo stesso.

Dall'antisiero ottenuto al termine del procedimento d'immunizzazione prescelto si separa la frazione contenente le IgG, mediante precipitazione seguita da dialisi, cromatografia, adsorbimento con polvere d'organo e coniugazione con fluorocromo. Quest'ultima si ottiene attraverso l'applicazione di metodiche ormai collaudate e riferite nei dettagli da Autori diversi (Mengeling e coll., 1963; Torlone e coll., 1968; Gardner e McQuillin, 1974; Kawamura, 1977).

Dopo coniugazione, esso deve essere titolato, al fine di stabilirne la diluizione d'uso, e sottoposto a controllo di specificità. A quest'ultimo scopo debbono essere eseguite prove diverse quali il «blocking test», l'attività nei confronti di tessuti e cellule non infetti ecc. Gli stessi controlli vanno ripetuti anche al momento dell'impiego a scopo diagnostico onde rilevare l'eventuale comparsa di false reazioni, positive o negative. L'evenienza di falsi negativi deve però ritenersi relativamente rara e legata alla presenza di una scarsa quantità di an-

tigene, ad una impropria conservazione del materiale in esame, alla presenza di muco-polisaccaridi che interferiscono sulla reazione antigene-anticorpo (Pillot, 1972).

Gli antisieri coniugati si conservano, senza perdita di titolo, allo stato liofilo ed a 4°C. In tali condizioni essi sono utilizzabili per oltre 6 anni dalla preparazione. Una volta ricostituiti in tampone fosfatico (PBS) e conservati a 4°C essi mantengono la propria attività per almeno 600 giorni (Green e coll., 1976).

L'immunofluorescenza nella diagnostica delle infezioni respiratorie del bovino.

I virus ritenuti responsabili di infezione respiratoria nel bovino appartengono alle seguenti Famiglie: *Paramyxoviridae, Herpetoviridae, Reoviridae, Picornaviridae* (Mohanty, 1978).

Paramyxoviridae - Infezione respiratoria può essere sostenuta, nel bovino, da due membri di questa Famiglia, indicati rispettivamente come *Myxovirus parainfluenzae 3* (PI 3) e Virus Respiratorio Sinciziale (VRS).

Le possibilità di impiego dell'IF a scopo diagnostico nel primo caso derivano da indagini diverse condotte con lo scopo di studiare la sintesi di antigene virale in colture cellulari sottoposte ad infezione. Maassab e Loh (1962) hanno impiegato a questo scopo una linea cellulare continua da rene di scimmia ed hanno rilevato che gli antigeni PI 3 erano dimostrabili, inizialmente, in posizione perinucleare e, successivamente, alla periferia delle cellule infette. Omar (1965), sempre impiegando colture di tessuto infette, ha osservato che la fluorescenza iniziale, a sede perinucleare, si estendeva successivamente a tutto il citoplasma delle cellule infette e riguardava infine la sola periferia delle stesse. L'applicazione della IF in corso di infezione da virus PI 3 su cellule derivate da rene di vitello ha dimostrato la comparsa di fluorescenza specifica dopo 8-12 ore dall'infezione e cioè molto più precocemente rispetto alla comparsa di effetto citopatico (ECP).

Dopo infezione sperimentale del vitello, l'applicazione della IFD è in grado di dimostrare la comparsa di antigeni PI 3 in corrispondenza delle cellule alveolari e bronchiali. Tale dimostrazione è possibile entro un periodo compreso fra 2 ed 8 giorni anche se i risultati

migliori si ottengono fra 4 e 5 giorni (Valicek e Mensik, 1969). È segnalata la possibilità di utilizzare sieri coniugati polivalenti (PI 3, IBR e BVD) allo scopo di individuare la presenza di antigeni virali diversi su monostrati cellulari infetti. Tali antisieri differenziano i diversi antigeni virali ma solo a condizone che le cellule vengano esaminate non oltre 16-18 ore dall'infezione (Mengeling e Van Der Maaten, 1971).

Sono state infine segnalate le condizioni ottimali per la rilevazione della presenza di virus PI 3 su tessuto colture sottoposte ad infezione. Risulta al riguardo che il sistema migliore è costituito da cellule primarie derivate da rene fetale bovino (Zuffa e Chumchal, 1978) oppure da cellule della linea AU-BEK, derivata anch'essa da rene fetale bovino (Cancellotti e Turilli, 1975).

Tentativi di applicazione della IFD alla diagnostica delle infezioni del bovino da PI 3 sono stati condotti da Ludwig e Paulsen (1969). Essi hanno dimostrato la presenza di virus in colture cellulari da rene e testicolo di vitello inoculate con essudato nasale prelevato da animali con malattia in atto. La positività alla IFD è inoltre risultata più precoce rispetto alla comparsa di emoagglutinina o di attività emoadsorbente nelle colture cellulari inoculate.

È dimostrato inoltre che il virus PI 3 è evidenziabile, oltre che nelle cellule di coltura infette, anche nelle secrezioni respiratorie di vitelli infettati sperimentalmente (Van der Maaten, 1969a; 1969b). Quest'ultima applicazione consente il riconoscimento degli animali infetti e si rivela anche molto sensibile, specie quando si ricorre all'esame del sedimento ricavato per centrifugazione del materiale da esaminare (Van der Heide, 1971; Baczynski e coll., 1974a).

I risultati ora indicati trovano conferma nelle indagini di numerosi altri ricercatori i quali hanno applicato l'IFD sia su monostrati cellulari che su sezioni al criostato allestite da organi diversi (Wellemans e coll., 1975; 1979; Cancellotti, 1973; Cancellotti e Turilli, 1975; Torlone e Titoli, 1973; Zoletto e coll., 1973; Valente e Fioroni, 1978).

Per quanto riguarda VRS, la presenza di antigeni specifici nelle colture infette è caratterizzata dalla comparsa di granuli fluorescenti a livello del citoplasma, della membrana citoplasmatica e degli pseudopodi (Woode e Smith, 1973). Rossi e Kiesel (1977; 1978) evidenziano una fluorescenza specifica in colture da polmone embriona-

le di bovino a partire dalla 16-18ª ora dall'infezione. Il numero delle cellule fluorescenti aumenta progressivamente fino alla 30ª ora mentre diminuisce in concomitanza del secondo ciclo replicativo del virus. L'intensità della fluorescenza è maggiore tra 24 e 36 ore dall'infezione, nel momento in cui all'interno delle cellule si accumula la maggiore quantità di antigene virale. Nella fase iniziale essa è caratterizzata dalla presenza nel citoplasma di granuli e di sottili fibrille fluorescenti disposte parallelamente all'asse longitudinale delle cellule. Trascorse 24 ore dall'infezione, contemporaneamente alla comparsa di cellule rotondeggianti, la fluorescenza tende a spostarsi dalla zona perinucleare verso la periferia del citoplasma. Osservazioni analoghe sono state riferite da Potgieter e Aldridge (1977), i quali hanno impiegato l'IFI per l'identificazione del VRS in colture cellulari.

L'IFI è stata anche utilizzata al fine di identificare uno stipite di VRS isolato, su monostrati da milza di vitello, da un animale clinicamente sano e di studiarne le modalità di diffusione su cellule coltivate *in vitro* (Woode, 1972; Woode e Smith, 1973).

È risultata inoltre possibile l'identificazione di VRS dopo inoculazione, in colture cellulari di essudato nasale prelevato da vitelli con sintomatologia respiratoria (Odegaard e Krogsrud, 1977). Infine, la applicazione della IFD consente di rilevare la presenza di antigene VRS in sezioni al criostato allestite dal polmone di animali infetti. La fluorescenza compare, in questo caso, sotto forma di granuli numerosi e brillanti a sede citoplasmatica (Wellemans e Leunen, 1975).

L'IFD è stata anche applicata alla ricerca di portatori di VRS. Essa ha consentito di rilevare la presenza di antigeni virali su colture di linfociti derivati da vitelli presenti in un allevamento nel quale era stata diagnosticata la presenza d'infezione (Gillette e Olson, 1973).

Una metodica descritta recentemente è quella indicata come NIFI (Neutralizzazione della Immunofluorescenza Indiretta). Ai fini della evidenziazione di antigeni VRS essa si dimostra specifica e sensibile specie nel caso di reperto diagnostico dubbio, più frequente nelle infezioni croniche o in quelle complicate da batteri (Wellemans e coll., 1979).

Herpetoviridae - Fra gli agenti responsabili di infezione nel bovino interessa in questa sede soltanto il virus della Rinotracheite Infettiva o IBR. Nonostante esso venga sintetizzato in corrispondenza del

nucleo, non risulta possibile la dimostrazione di fluorescenza in questa sede ma soltanto in sede citoplasmatica.

Su colture primarie o secondarie da rene fetale di embrione bovino, la presenza di fluorescenza specifica è rilevabile fin dopo 2-6 ore dall'infezione e si manifesta sotto forma di piccoli granuli disposti nella zona perinucleare. Dopo 12 ore e prima ancora della comparsa di effetto citopatico, i granuli fluorescenti aumentano di volume oppure si presentano sotto forma di ammassi alla periferia del nucleo. A 20-24 ore il numero delle cellule con citoplasma intensamente fluorescente è rilevante mentre, in seguito alla comparsa di effetto citopatico, esse assumono forma rotondeggiante ed appaiono totalmente fluorescenti (Bergmann e Hahnefeld, 1967; Jasty e Chang, 1969; Theil e coll., 1971; Feteanu e Coman, 1972; Zoletto e coll., 1973).

Su colture da cellule testicolari di vitello la comparsa di fluorescenza è dimostrabile già a 90 minuti di distanza dall'infezione (Gratzek e coll., 1966). È tuttavia da rilevare che tale fenomeno è correlato anche con la dose di virus impiegata per l'infezione delle colture. Infatti, mentre la fluorescenza compare dopo 6 ore a seguito di inoculazione di $10^{6,6}$ DCP_{50}, bisogna attendere fino a 24 ore nel caso dell'inoculazione di $10^{1,6}$ DCP_{50} (Zuffa e coll., 1976).

La tecnica dell'IFI è stata applicata con successo per la dimostrazione del virus IBR su colture di cellule inoculate con secreto nasale o estratti d'organo provenienti da vitelli sottoposti ad infezione sperimentale (Gratzek e coll., 1966; Narita e coll., 1978; Miller e coll., 1978). Essa infatti appare capace di fornire risultati comparabili con quelli ottenuti attraverso l'isolamento del virus (Popisil e coll., 1972).

Nel caso della diagnosi di IBR spontanea, l'IFD viene oggi correntemente applicata su sezioni d'organo nonché su tessuto-colture inoculate con materiale patologico sospetto e costituito da secrezioni diverse o da estratti d'organo (Schipper e Chow, 1968; Reed e coll., 1971; Popisil e coll., 1972; Torlone e Titoli, 1973; Zoletto e coll., 1973; Cancellotti, 1973; Morozzi e coll., 1975; Espinasse e coll., 1974; Wellemans e Leunen, 1975; Cancellotti e Turilli 1975; Zuffa e coll., 1976; Valente e Fioroni, 1978; Wellemans e coll., 1979).

Togaviridae - Nell'ambito di questa Famiglia interessa il virus «Diarrea da Virus - Malattia delle Mucose», noto anche come BVD e

responsabile di una malattia del bovino diffusa su scala mondiale. Numerosi stipiti di tale virus risultano incapaci di provocare la comparsa di ECP su colture di cellule ed inoltre, quando presente, esso può risultare di scarsa entità e di difficile rilevazione. Da ciò deriva l'utilità delle tecniche di IF ai fini della dimostrazione del virus BVD su materiale sospetto. Dal punto di vista della struttura antigene esso risulta abbastanza uniforme e correlato con il virus della Peste Suina Classica (PSC) (Darbyshire, 1962). Ciò determina una chiara reattività crociata fra antisieri coniugati PSC e cellule infettate con BVD Mengeling e coll., 1963, Castrucci e coll., 1974).

La possibilità di applicazione delle tecniche di IF per la rilevazione di antigeni BVD è documentata da Fernelius (1964). Tali antigeni vengono rilevati anche quando i corrispondenti stipiti virali non risultano capaci di provocare ECP ed inoltre i risultati delle prove di IFD appaiono sovrapponibili a quelli della SN.

Stipiti diversi del virus BVD determinano la comparsa di fluorescenza con caratteristiche costanti (Kokles e coll., 1967) e che compare più precocemente rispetto all'ECP (Zoletto e coll., 1973). Infatti essa è già presente dopo 12 ore dall'infezione e determina, in un numero limitato di cellule, la comparsa di piccole granulazioni in posizione paranucleare. Il numero di tali cellule aumenta con il passare delle ore e la fluorescenza diffonde all'intero citoplasma (Fernelius, 1969; Mangeling e Van der Maaten, 1971; Cancellotti e coll., 1972).

Applicata alla determinazione della presenza di antigene virale in organi di vitelli infettati sperimentalmente, la IFD fornisce risultati analoghi a quelli delle prove d'isolamento del virus. In alcuni casi, tuttavia, si osserva anche che la comparsa di fluorescenza specifica non è associata con la presenza di virus infettante e viceversa (Fernelius e Lambert, 1969).

La IF è stata anche impiegata per lo studio dell' evoluzione dell'infezione sperimentale da BVD nel vitello (Rhode e Liess, 1970). Al riguardo è stato possibile rilevare che fluorescenza specifica è presente nei linfociti circolanti dal 2° al 18° giorno mentre in altri organi e secrezioni (muco nasale, saliva, milza, linfonodi) essa compare più tardivamente pur persistendo fino al 18° giorno.

La dimostrazione di antigene BVD su monostrati cellulari inoculati con materiale sospetto è ottenibile con successo attraverso l'applicazione della IFD (Fernelius, 1964; Fernelius e Lambert, 1969;

Rohde e Liess, 1970; Rucherbauer e coll., 1971; Cancellotti e coll., 1972; Zoletto e coll., 1973; Bertocchi e coll., 1973; Cancellotti e Turilli, 1975; Prager e Liess, 1976; Bechmann e coll. 1977; McClurkin e coll., 1979). Soddisfacenti sono anche i risultati che si ottengono su sezioni al criostato di organi diversi (Rucherbauer e coll., 1971; Prager e Liess, 1976; Bechmann e coll., 1977) fra i quali sembrano da preferire l'intestino e i linfonodi mesearici, il rene e gli epiteli del cavo orale (Meyling, 1970).

Di notevole interesse appaiono i risultati di una indagine comparativa riferita da Bechmann e coll. (1977). Essi hanno esaminato ghiandole parotidee, milza, linfonodi meseraici e mediastinici, prelevati da 100 vitelli con sintomi riferibili ad infezione da BVD. La IF è stata applicata su sezioni al criostato mentre l'isolamento del virus è stato tentato a partire da estratti degli stessi organi inoculati su tessuto-colture. Queste sono state poi utilizzate per la rilevazione della comparsa di fluorescenza, da un lato, e di effetto citopatico dall'altro. Le tre prove ora indicate hanno fornito risultato positivo in 20, 59 e 43 animali rispettivamente.

Adenoviridae - Adenovirus del bovino sono stati isolati da animali con disturbi respiratori in atto o apparentemente sani. Dopo infezione sperimentale del vitello, per via nasale o tracheale, essi si rilevano con maggiore frequenza a partire da tamponi nasali e rettali, nonché in trachea, bronchi, polmoni e intestino (Mohanty, 1971). Dal punto di vista sierologico, gli Adenovirus del bovino vengono differenziati in 8 sierotipi numerati progressivamente e suddivisi in 2 sierogruppi. Al primo appartengono i sierotipi da 1 a 3, al secondo gli altri. La tipizzazione viene effettuata mediante siero-neutralizzazione ma è da notare anche la possibilità di impiego della fissazione del complemento e, più in particolare, della fissazione del complemento fluorescente. Questa sfrutta la capacità posseduta da un siero anti-complemento di cavia, coniugato con fluorocromo, a legarsi sul complesso antigene-anticorpo-complemento rendendolo fluorescente alla luce ultravioletta (Baczynski e coll., 1974b). Quanto alla coltura di Adenovirus bovini, è da notare che quelli del Gruppo 1 replicano su cellule renali di vitello mentre quelli del Gruppo 2 preferiscono le cellule testicolari, sempre di vitello (Bartha, 1969).

La comparsa di fluorescenza in colture cellulari infettate con Adenovirus del gruppo 1 è relativamente precoce, essendo rilevabile alla

18ª ora dall'infezione, mentre in presenza di Adenovirus del gruppo 2 essa non è rilevabile fino alla 24ª ora. Nei due casi, fluorescenza compare in sede nucleare sotto forma di piccoli granuli che aumentano di volume e confluiscono fino ad investire l'intero nucleo. Tuttavia, alcuni granuli fluorescenti possono essere osservati anche in sede citoplasmatica (Mohanty, 1971).

Reoviridae e Picornaviridae - Nella letteratura consultata mancano specifici riferimenti riguardo all'applicazione delle tecniche di IF per la diagnosi delle infezioni del bovino sostenute da membri di queste Famiglie. Si tratta comunque di agenti largamente diffusi e per i quali le tecniche suddette potrebbero offrire concreti vantaggi non soltanto in campo diagnostico. D'altra parte non v'è motivo di ritenere che esse non possano trovare le stesse applicazioni indicate per gli altri virus responsabili di infezione respiratoria.

Limitatamente a Reovirus tipo 1 e 3 esiste la segnalazione secondo la quale, in colture cellulari infette, la IFD rivela l'esistenza di reazioni crociate fra i due mentre risulta completamente negativa in presenza di virus Reo-like. Quando presente, la fluorescenza compare sotto forma di filamenti disposti intorno al nucleo e diffonde successivamente fino ad interessare l'intero citoplasma delle cellule in via di degenerazione (Welch e Twiehaus, 1973).

Conclusioni

Sulla base di quanto indicato nella letteratura ed anche dalla esperienza personalmente acquisita si può concludere che le tecniche di IF, nelle loro diverse articolazioni, trovano nelle virosi respiratorie del bovino un vasto ed importante settore d'impiego.

In primo luogo esse consentono un rapido ed agevole accertamento della componente virale in corso di focolai di malattia, il che rende possibile di verificare la relativa incidenza di ciascuno dei virus indicati nel determinismo di singoli casi o di focolai. Secondariamente, attraverso la IF, può essere studiata l'evoluzione patogenetica delle singole infezioni, tenuto conto che essa rende possibile la individuazione della presenza di antigene virale non soltanto negli organi della respirazione ma anche in altri siti e distretti dell'organismo, compresi gli elementi figurati del sangue. Infine, attraverso l'applicazione della fluorescenza indiretta, è possibile l'esecuzione di inchieste

di epidemiologia sierologica volte a determinare l'incidenza e la diffusione di singoli agenti d'infezione e, sia pure in via subordinata, a predisporre i necessari strumenti di profilassi anche immunizzante.

Ai requisiti ora menzionati va infine aggiunto quello, non meno interessante, che riguarda la relativa semplicità di applicazione delle singole tecniche di IF e di interpretazione dei reperti. Ciò potrebbe consentire una capillare diffusione del metodo e coinvolgere laboratori anche non provvisti delle complesse strutture previste per l'esecuzione delle indagini di ordine virologico.

BIBLIOGRAFIA

BACZYNSKI Z., MAJEWSKA H., SKULMOWSKA D. e KARPINSKI S. - Isolation and identification of parainfluenza virus and infectious bovine rhinotracheitis virus from nasal swabs of diseased cattle.
Bull. vet. Inst. Pulawy. 18 (1974a) 21-27.

BACZYNSKI Z., MAJEWSKA H. e SKULMOWSKA-KRYSZKOWSKA D. - Differential diagnostics of mixed infections with pneumotropic and enterotropic viruses. II. Immunofluorescent diagnostics of bovine adenoviruses.
Bull. vet. Inst. Pulawy. 18 (1974b) 66-72.

BARTHA A. - Proposal for subgrouping of Bovine Adenoviruses.
Acta vet. Acad. Sci. hung. 19 (1969) 319-321.

BASKERVILLE A. e LLOYD G. - A method for the collection of nasal epithelial cells and secretion from domestic animals.
Vet. Rec. 101 (1977) 168-170.

BECHMANN G., NEUMAN A. e PLOGER W. - Der Erregernachweis der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease (BVD/MD) im Vergleich zwischen der Organ-Fluoreszenz-Geffrierschnittmethode und der Direktanzuchtung in der Gewebekultur.
Dtsch. Tierarztl. Wschr. 84 (1977) 373-375.

BERGMANN H. e HAHNEFELD H. - Immunofluoreszenzstudien mit Viren der infektiösen Rhinotracheitis un des Bläschenausschlages des Rindes in Kälbernierenzellkulturen.
Arch. exp. Vet. Med. 21 (1967) 801-808.

BERTOCCHI D., CANCELLOTTI F. e STILAS B. - Focolaio di malattia delle mucose in Provincia di Verona - Rilievi clinici, anatomo-patologici, isolamento ed identificazione del virus.
Atti Soc. Buiatria. 5 (1973) 259-265.

CANCELLOTTI F. - L'immunofluorescenza.
Vet. Ital. 24 supplemento 11 (1973) 7-27.

CANCELLOTTI F. e TURILLI C. - Isolamento dei virus IBR, PI-3 e BVD su cellule AU-BEK. Vet. Ital. 26 (1975) 3-12.

CANCELLOTTI F., ZANIN E., IRSARA A. e ZOLETTO R. - Uso di cellule di milza di feto bovino per l'isolamento e l'identificazione mediante immunofluorescenza di un ceppo di virus della malattia delle mucose-diarrea da virus.
Arch. Vet. Ital. 6 (1972) 435-441.

CASTRUCCI G., TITOLI F., RANUCCI S., CASTRO PORTUGAL F. L., CILLI V. e PEDINI B. Study of the experimental infection of pigs with bovine viral diarrhea (BVD) virus. Boll. Ist. Sieroter. Milanese, *53* (1974), 585.

COONS A. H., CREECH H. J., JONES R. N. e BERLINER E. - The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45 (1942) 159-170.

COONS A. H. e KAPLAN M. N. - Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J. exper. Med. 91 (1950) 1-13.

DAISY J. A., LIEF F. S. e FRIEDMAN H. M. - Rapid diagnosis of influenza A infetcion by direct immunofluorescence of nasopharyngeal aspirates in adults.
J. Clin. Microbiol. 9 (1979) 688-692.

DARBYSHIRE J. H. - Agar gel diffusion studies with a mucosal disease of Cattle. I. A serological relationship between a mucosal disease and swine fever.
Res. Vet. Sci. 118 (1962) 125-128.

ESPINASSE J., GILBERT Y. e SAURAT P. - Differents aspects de la rhinotracheite infectieuse bovine (IBR/IPV) dans un troupeau laitier du sud-ouest de la France.
Revue Méd. vét. 125 (1974) 1441-1451.

FERNELIUS A. L. - Noncypathogenic bovine viral diarrhea viruses detected and titrated by immunofluorescence.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 28 (1964) 121-126.

FERNELIUS A. L. - Characterization of bovine viral diarrhea viruses. IV. Sequential developement of BVD viral antigen in cell cultures studied by immunofluorescence.
Arch. ges. Virusforsch. 27 (1969) 1-12.

FERNELIUS A. L. e LAMBERT G. - Detection of bovine viral diarrhea virus and antigen in tissues of experimentally infected calves by cell inoculation and fluorescent antibody techniques.
Am. J. Vet. Res. 30 (1969) 1551-1559.

FETEANU A. e COMAN I. - Identification of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus by immunofluorescence techniques.
Archiva Vet. 8 (1972) 25-31.

GARDNER P. S. e McQUILLIN J. - Rapid virus diagnosis - Application of immunofluorescence.
Butterworth e Co. Editori, Londra (1974).
GILLETTE K. G. e OLSON C. - Demonstration of bovine syncytial viral antigen in bovine lymphocyte cultures by IF.
Am. J. Vet. Res. 34 (1973) 493-495.
GREEN J. H., GRAY S. B. e HARRELL W. K. - Stability of fluorescent antibody coniugates stored under various conditions.
J. Clin. Microbiol 3 (1976) 1-4.
GRATZEK J. B., JENKINS R. A., PETER C. P. e RAMSEY F. K. - Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: comparative developmental study by fluorescent antibody tracing an electron microscopy.
Am. J. Vet. Res. 27 (1966) 1573-1582.
JASTY B. e CHANG P. W. - Infectious bovine rhinotracheitis virus in bovine kidney cells: sequence of viral production, cellular changes, and localization of viral nucleic acid and protein.
Am. J. Vet. Res. 30 (1969) 1325-1332.
KAWAMURA A. Jr. - Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press. Tokyo (1977).
KOKLES R., URBANECK D., LIEBERMAN H. e OLECHNOWITZ A. F. - Vergleichende fluoreszenzimmunologische und zytopathologische Untersuchungen mit verschiedenen Virusstämmen der Mucosal Disease des Rindes.
Arch. exp. Vet. Med. 21 (1967) 1295-1304.
LUDWIG H. e PAULSEN J. - Isolierung und fluoreszenzserologische Untersuchung von Parainfluenza - 3-Viren aus Vaginal-und Nasentupfern vom Rind.
Zentbl. Vet. Med. 16B (1969) 231-239.
MAASSAB H. F. e LOH P. C. - Fluorescent antibody studies in tissue culture of parainfluenza type 3 infection.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109 (1962) 897-900.
McCLURKIN A. W., CORIA M. F. e CUTLIP R. C- . Reproductive performance of apparently healty cattle persistently infected with bovine viral diarrea virus.
Javma 174 (1979) 1116-1118.
MENGELING W. L., GUTEKUNST D. E., FERNELIUS A. L. e PIRTLE E. C. - Demonstration of an antigenic relationship between hog cholera and Bovine Viral Diarrhea Viruses by immunofluorescence.
Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27 (1963) 162-164.
MENGELING W. L. e VAN DER MAATEN M. J. - Identification of selected animal viruses with fluorescent antibodies prepared from multivalent antiserums.
Am. J. Vet. Res. 32 (1971) 1825-1833.
MEYLING A. - Demonstration of VD-virus by the fluorescent antibody technique in tissue of cattle affected with bovine viral diarrhea (mucosal disease).

Acta vet. scand. 11 (1970) 59-72.
MILLER R. B., SMITH M. W. e LAWSON K. F. - Some lesions observed in calves born to cows exposed to the virus of infectious bovine rhinotracheitis in the last trimester of gestation.
Can. J. Comp. Med. 42 (1978) 438-455.
MOHANTY S. B. - Bovine respiratory viruses.
Adv. Vet. Science comp. Med. 22 (1978) 83-109.
MOHANTY S. B. - Comparative study of bovine adenoviruses.
Am. J. Vet. Res. 32 (1971) 1899-1905.
MOROZZI A., GIALLETTI L., TITOLI F., FIORONI A. e CASTRO PORTUGAL F. L. - Osservazioni sull'applicazione della tecnica della immunofluorescenza nella diagnosi della rinotracheite infettiva (IBR) dei bovini.
Atti Soc. Ital. Sisvet. 29 (1975) 678-681.
NARITA M., INUI S., NAMBA K. e SHIMIZU Y. - Neural changes in calves intravaginally inoculated with infectious bovine rhinotracheitis virus.
J. Comp. Path. 88 (1978) 381-386.
ODEGAARD O. A. e KROGSRUD J. - A field outbreak caused by bovine respiratory syncytial virus.
Acta vet. Scand. 18 (1977) 429-431.
OMAR A. R. - Cytopathic effect and immunofluorescence produced by the J 121 strain of bovine parainfluenza 3 virus in tissue culture.
J. comp. Path. 75 (1965) 287-297.
OMS - Laboratory techniques for rapid diagnosis of viral infections: a memorandum.
Bull. World Health Organ. 55 (1977) 33-37.
PILLOT J. - Specificité et fidelité des reactions d'immunofluorescence.
Bull. Inst. Pasteur 70 (1972) 353-374.
POPISIL Z., ROZKOSNY V. e MENSIK J. - Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by immunofluorescence.
Acta Veterinaria Brno 41 (1972) 281-286.
POTGIETER L. N. D. e ALDRIDGE P. L. - Use of the fluorescent antibody test in the detection of bovine respiratory syncytial virus antibodies in bovine serum.
Am. J. Vet. Res. 38 (1977) 1341-1343.
PRAGER D. e LIESS B. - Nachweis von Immunkomplex-Komponenten in Nierenglomerula bei der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease.
Zbl. Vet. Med. 23B (1976) 458-469.
REED D. E., BICKNELL E. J., LARSON C. A., KNUDTSON W. U. e KIRKBRIDE C. A. - Infectious bovine rhinotracheitis virus-induced abortion: rapid diagnosis by fluorescent antibody technique.
Am. J. Vet. Res. 32 (1971) 1423-1426.
ROHDE G. e LIESS B. - Untersuchungen zur Pathogenese der Virusdiarrhoe-Mucosal Disease des Rindes unter Verwendung einer heterotypischen. Immunofluoreszenztechnik.
Zbl. Vet. Med. 17B (1970) 686-700.

ROSSI C. R. e KIESEL G. K. - Bovine respiratory syncytial virus infection of bovine embryonic lung cultures: a kinetic study by the fluorescent antibody technique.
Am. J. Vet. Res. 38 (1977) 1901-1904.

ROSSI C. R. e KIESEL G. K. - Bovine respiratory syncytial virus infection of bovine embryonic lung cultures: enhancement of infectivity with diethylaminoethyl-dextran and virus-infected cells.
Arch. Virol. 56 (1978) 227-236.

RUCHERBAUER G. M., GIRARD A., BANNISTER G. L. e BOULANGER P. - Studies on bovine virus diarrhea: serum neutralization, complement-fixation and immunofluorescence.
Can. J. Comp. Med. 35 (1971) 230-238.

SCHIPPER L. A. e CHOW T. L. - Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence.
Can. J. Comp. Med. 32 (1968) 412-415.

THEIL K. W., MOHANTY S. B. e HETRICK F. M. - Intracellular localization and sequential development of infectious bovine rhinotracheitis viral antigens.
Am. J. Vet. Res. 32 (1971) 1955-1962.

TORLONE V. e TITOLI F. - Applicazione della immunofluorescenza per la diagnosi di malattie infettive presso l'Istituto Zooprofilattico di Perugia.
Vet. Ital. 24, supplemento 11 (1973) 58-62.

TORLONE V., TITOLI F., GIALLETTI L. e CASTRO PORTUGAL F. L. - Impiego della immunofluorescenza per la titolazione degli anticorpi neutralizzanti il virus della peste suina classica.
Arch. Vet. Ital. 19 (1968) 81-89.

VALENTE C. e FIORONI A. - Accertamento di agenti virali in giovani bovini colpiti da sindrome respiratoria.
Arch. Vet. Ital. 22 (1978) 14-17.

VALICEK L. e MENSIK J. - Pathogenesis of experimental infection of calves with Myxovirus parainfluenzae 3. II. Demonstration of viral antigen by the fluorescent antibody technique.
Doc. vet. Brno 7 (1969) 99-108.

VAN DER HEIDE L. - The fluorescent antibody technique in the diagnosis of bovine respiratory virus diseases.
Proc. 74th an. Meet. USA Health Ass. 1970 (1971) 584-588.

VAN DER MAATEN M. J. - Immunofluorescent studies of bovine para-influenza 3 virus. I. Cell cultures and experimentally infected hamsters.
Can. J. comp. Med. 33 (1969a) 134-140.

VAN DER MAATEN M. J. - Immunofluorescent studies of bovine para-influenza 3 virus. II. Experimentally infected calves.
Can. J. comp. Med. 33 (1969b) 134-140.

WELCH A. B. e TWIEHAUS M. J. - Cell culture studies of a neonatal calf diarrhea virus.
Can. J. comp. Med. 37 (1973) 287-294.

WELLEMANS G. e LEUNEN J. - Le virus respiratorie syncytial et les troubles respiratoires des bovins.
Ann. Med. Vet. 119 (1975) 359-369.

WELLEMANS G., VAN OPDNBOSCH E. e DE KEGEL D. - La neutralisation de l'immunofluorescence indirecte (NIFI): une technique specifique et quantitative pour la mise en évidence d'antigenes viraux.
Ann. Med. Vét. 123 (1979) 185-194.

WOODE G. N. - Isolation of bovine syncitial virus in Britain.
Vet. Rec. 91 (1972) 363.

WOODE G. N. e SMITH K. - Spread of bovine syncitial virus in cell culture.
J. gen. Virol. 21 (1973) 425-427.

ZOLETTO R., CANCELLOTTI F. e STILAS B. - Applicazione dell'immunofluorescenza per la diagnosi di alcune malattie virali dei bovini.
Vet. Ital. 24, supplemento 11 (1973) 63-69.

ZUFFA A. e CHUMCHAL R. - Immunofluorescencia e virusom PI-3.
Vet. Medicina 23 (1978) 289-304.

ZUFFA A., CHUMCHAL R. e GRUNERT Z. - Mikroepidemiologie und Mikroplaquetitration des virus der infetiösen Rhinotracheitis des Rindes auf primären Kälbenrierenzellen mittels Immunofluoresenz.
Arch. exp. Vet. Med. 30 (1976) 441-457.

E. MAGLIONE

SIERODIAGNOSTICA NELLE INFEZIONI DA VIRUS RESPIRATORIO SINCIZIALE DEI BOVINI

La diagnostica sierologica nelle infezioni respiratorie dei bovini, come d'altronde tutte le prove sierologiche intese alla dimostrazione degli anticorpi sierici, ha sempre ed esclusivamente il significato di un diagnostico retrospettivo o a posteriori. Né peraltro tale significato è privo di interesse teorico e pratico soprattutto negli allevamenti intensivi dove le infezioni respiratorie possono assumere una notevole diffusione ed un carattere persistente e dove, con maggior interesse sia sul piano terapeutico e sia soprattutto sul piano profilattico, è necessaria una diagnosi eziologica esatta nell'ampia e talora non facilmente identificabile gamma degli agenti causali.

Nelle infezioni virali respiratorie dei bovini, in particolare, l'indagine sierologica, soprattutto se basata sul principio della sieroconversione, ha una più stretta aderenza alla realtà della infezione attiva o appena superata. Come è noto infatti molti virus respiratori dei bovini non sempre causano sindromi cliniche apprezzabili né peraltro la loro presenza nell'organismo animale è sempre il solo indice della malattia in atto. Ne consegue che, più che all'isolamento del virus, metodo comunque di indiscutibile valore diagnostico eziologico, assume, sotto l'aspetto causale della sindrome morbosa, un coerente significato diagnostico la presenza e l'incremento o la comparsa e l'incremento degli anticorpi nel siero di sangue. La sola presenza degli anticorpi sierici non è di per se stessa indicativa per diversi ordini di motivi fra i quali la grande diffusione dei virus respiratori dei bovini talora non disgiunta dal già accennato fatto che alcuni di essi sono scarsamente patogeni e richiedono per il determinismo della malattia la concomitanza di fattori condizionanti o di altri agenti eziologici complicanti. Il reperto sierologico positivo può quindi significare una superata infezione, una infezione in atto, clinicamente manifesta o

non, un pregresso trattamento immunizzante ed infine, nei soggetti giovanissimi, uno stato di immunità passiva colostrale. Né, infine, va trascurato il fatto che alcuni virus respiratori non determinano, in certi casi, titoli anticorpali molto elevati principalmente nei soggetti giovani.

Per tutte queste evenienze il diagnostico sierologico non può essere limitato al rilievo della presenza degli anticorpi nel siero bensì alla sieroconversione positiva cioè ad un congruo aumento degli anticorpi (di solito almeno triplicato) nel secondo di due prelievi di sangue effettuati ad una quindicina di giorni di distanza. Va da sé che la comparsa degli anticorpi al secondo esame, quando il primo è negativo, sia da interpretare come sieroconversione positiva.

Queste considerazioni possono essere generalizzate per quanto riguarda il significato della sierodiagnostica nelle infezioni virali respiratorie dei bovini, ma non sembra fuor di luogo accennare ancora alcuni particolari inerenti alle infezioni da virus Sincinziale Respiratorio dei Bovini. Infatti l'isolamento di questo virus presenta notevoli difficoltà determinate da varie concause fra le quali la pratica impossibilità di reperire il virus a malattia conclamata: esso infatti può essere isolato dal muco nasale, ma solo all'inizio del processo infettivo quando mancano ancora i sintomi o quando essi sono ancora poco appariscenti (Edington e Jacobs - 1970; Wellemans e Leunen - 1975). Wellemans e Collaboratori (1979) in nove anni di tentativi effettuati su centinaia di bovini risultati sierologicamente positivi riuscirono ad isolare solamente due volte il virus. D'altro canto il virus, che richiede monostrati cellulari bovini e preferibilmente cellule renali o testicolari di feto, può presentare dei periodi di incubazione assai lunghi fino a 17 (Inaba e Coll. - 1972), 32 (Paccaud e Jacquier - 1970) e 45 giorni (Wellemans e Coll. - 1970). Tali tempi di incubazione richiedono particolarità di tecnica per far sopravvivere le cellule per periodi così lunghi. E ancora l'adattamento del virus al substrato colturale non è costante per cui può avvenire che, dopo aver ottenuto un certo effetto citopatico, non si riesce a riprodurlo (avviene quel fatto che nei laboratori di virologia si indica volgarmente dicendo che il virus «scappa di mano»). Appare quindi chiaro come l'isolamento e l'identificazione del virus a scopo diagnostico presentino notevoli difficoltà ed assumano di conseguenza maggior interes-

se nella ricerca scientifica pura che non nella pratica diagnostica corrente.

Per contro le ricerche sierologiche portano all'identificazione di anticorpi variamente svelabili taluni dei quali a rapida comparsa ed altri a più lunga latenza tantoché alcuni Autori hanno ipotizzato che con certe prove si possano identificare infezioni relativamente recenti corrispondenti a rapide risposte immunitarie e con altre prove si possano invece individuare anticorpi a più tardiva comparsa (Wellemans e Leunen - 1975).

Le principali prove sierologiche in uso per diagnosticare le infezioni da virus Respiratorio Sinciziale dei Bovini sono: la siero-neutralizzazione, la fissazione del complemento, la immunodiffusione, la immunofluorescenza indiretta e la emoagglutinazione indiretta.

Siero-neutralizzazione

La prova di siero-neutralizzazione, fra tutte quelle atte ad evidenziare gli anticorpi sierici, rappresenta la più tipica soprattutto perché l'attività degli anticorpi così dimostrabili dovrebbe corrispondere alla più stretta attività protettiva. Questo tipo di ricerca esige la disponibilità di un ceppo virale bene adattato alle cellule, la disponibilità costante di cellule adatte e di un certo tempo per l'esecuzione della prova. I titoli siero-neutralizzanti possono essere indicativi anche se non molto elevati. È molto usata sia a scopo diagnostico che di ricerca.

La prova di siero-neutralizzazione può essere effettuata secondo diverse metodiche, ma le più impiegate sono generalmente: il metodo classico in tubi, il micrometodo ed il metodo della riduzione del numero delle placche.

Il metodo classico in tubi comporta l'impiego di 600-6000 DCP_{50} di virus, un tempo di contatto di 60' a temperatura ambiente, monostrati di cellule renali di feto bovino, incubazione a 34°C. La lettura viene effettuata quotidianamente fino al decimo giorno e comunque fin quando i monostrati di controllo presentano effetto citopatico almeno del 75%. Viene considerato titolo neutralizzante del siero il reciproco della più alta diluizione capace di impedire lo sviluppo di formazioni sinciziali (Rosenquist - 1974).

Il micrometodo viene effettuato in piastre microtiter ponendo in

contatto il siero con 100 DCP_{50} di virus e aggiungendo, dopo 60', cellule renali di feto bovino (possono essere impiegate anche cellule MDBK, GBK, AU-BEK) ed incubando a 37°C in termostato e con atmosfera di CO_2 al 5%. La lettura viene eseguita giornalmente fino al decimo giorno. È generalmente considerata soglia di positività la diluizione sieroneutralizzante di 1/4 (Paccaud e Jacquier - 1970; Rossi e Kiesel - 1974; Lehmkuhl e Gough - 1977; Carlotto e Cancellotti - 1978).

Il metodo della riduzione del numero delle placche consiste nell'impiego di 50-150 PFU; periodo di contatto a temperatura ambiente di tre ore; inoculazione della miscela siero-virus in piastre di coltura di cellule renali bovine (linea GBK). La lettura viene effettuata dopo cinque giorni di incubazione a 37°C in atmosfera col 5% di CO_2. È considerato titolo neutralizzante del siero il reciproco della diluizione che riduce il numero delle placche del 50% (Smith e Coll. - 1975).

Fissazione del complemento

La ricerca degli anticorpi fissanti il complemento è largamente usata nella diagnostica sierologica delle infezioni da virus Respiratorio Sinciziale dei Bovini sia per la notevole sensibilità, sia perché tali anticorpi sono a comparsa relativamente rapida anche se meno persisitenti degli anticorpi siero-neutralizzanti e sia, infine, per il tempo relativamente breve necessario per espletare la prova. Anche seguendo questo metodo diagnostico è necessario uno stipite virale ben adattato in colture cellulari per la produzione dell'antigene.

La fissazione del complemento può essere effettuata col metodo classico o col micrometodo: in ogni caso l'antigene è costituito da virus ottenuto da coltura di cellule renali di bovino opportunamente estratto e concentrato. I tempi di contatto variano da 12 a 18 ore alla temperatura di 40°C e, dopo l'aggiunta del sistema emolitico, da 30' a 60' alla temperatura di 37°C. Il titolo del siero può essere rappresentato dall'inverso dell'ultima diluizione del siero che fissa completamente oppure con il reciproco della diluizione che inibisce il 50% dell'emolisi (Takahashi e Coll. - 1975; Wellemans - 1977; Perrin e Coll. - 1979).

Immunodiffusione

La immunodiffusione pone in evidenza in circa la metà dei casi una risposta immunitaria molto rapida (Wellemans e Leunen - 1975). È sensibile, ma richiede, anche seguendo la metodica classica, che è quella più usata, notevoli accorgimenti tecnici ed un considerevole tempo d'esecuzione per cui viene impiegata più a scopo di ricerca scientifica che non a scopo diagnostico corrente.

Immunofluorescenza indiretta

L'impiego della immunofluorescenza indiretta dovrebbe rappresentare la prova più largamente usata per la sua sensibilità, paragonabile certamente a quella della siero-neutralizzazione ed a quella della fissazione del complemento, ma tecnicamente di facile e comoda realizzazione anche perché i vetrini col virus e l'antisiero marcato possono essere conservati nei laboratori già pronti all'uso e in tali casi il tempo d'esecuzione è brevissimo.

La prova consiste nell'impiego di un siero coniugato anti siero bovino, di vetrini con cellule infette da virus Respiratorio Sinciziale dei Bovini e del siero bovino in esame.

L'antisiero viene di solito preparato dal coniglio e viene coniugato con isotiocianato di fluoresceina.

I vetrini sono allestiti con colture di virus Respiratorio Sincinziale dei Bovini in cellule renali primarie o in subcolture di rene di vitello, in cellule polmonari primarie di embrione bovino od anche in cellule in linea come le PK_{15}. Essi sono fissati in acetone freddo per 10' e poi possono essere conservati in congelatore anche per diversi mesi.

La prova viene eseguita col siero in esame opportunamente diluito, posto sui vetrini con le cellule infette e lasciato per 30-60' in ambiente umido a 37°C. Successivamente il vetrino viene posto in tampone fosfato a pH. 7,2 per 20-30' e poi collocato per 30' a temperatura di 37°C in contatto col siero coniugato. Infine il vetrino viene ancora lavato per 30' in tampone fosfato. L'osservazione deve essere effettuata col microscopio a fluorescenza.

Il titolo del siero corrisponde all'inverso dell'ultima diluizione che permette di rilevare una fluorescenza specifica nelle cellule infet-

te (Potgieter e Aldridge - 1977; Rossi e Kiesel - 1977; Wellemans - 1977; Perrin e Coll. - 1979).

Emoagglutinazione indiretta

La prova di emoagglutinazione indiretta (passiva) è stata pubblicata lo scorso anno da Espinasse e Collaboratori (1978) ed è stata proposta per l'esecuzione contemporanea, ma separata, di sette diversi antigeni: virus della Rinotracheite infettiva, virus della Malattia delle mucose, Reovirus III, Adenovirus III, virus Respiratorio Sinciziale, virus Parainfluenza 3 (al quale viene distrutta la emoagglutinina col trattamento al freon) e *Chlamydia psittaci.*

I singoli antigeni ottenuti da colture cellulari ed opportunamente concentrati vengono fatti adsorbire a globuli rossi di montone previamente formolati e tannati e posti a contatto col siero in esame variamente diluito in placche microtiter. Si lascia a temperatura ambiente e la lettura viene effettuata quando i globuli rossi di controllo sono sedimentati.

Considerazioni

Dei metodi sierodiagnostici accennati i più sperimentati e quelli più largamente usati sono la siero-neutralizzazione, la fissazione del complemento e l'immunofluorescenza indiretta che risultano tutti decisamente sensibili e specifici. Da prove comparative effettuate fra la fissazione del complemento e la immunofluorescenza indiretta non risultano sostanziali differenze all'infuori del titolo che in genere è più alto col secondo metodo (Wellemans - 1977). La immunofluorescenza comparata con la siero-neutralizzazione in placca non permette di rilevare differenze considerevoli (Potgieter e Aldridge - 1977) ed infine la fissazione del complemento e la sieroneutralizzazione danno risultati analoghi, ma la siero-neutralizzazione comporta titoli più elevati (Takahashi e Coll. - 1975).

Per quanto riguarda il tempo d'esecuzione di queste prove la immunofluorescenza indiretta è la più rapida, segue la deviazione del complemento che è un po' più lenta ed infine la siero-neutralizzazione che richiede qualche giorno.

In merito al titolo degli anticorpi in rapporto al momento dell'in-

fezione Wellemans (1977) è dell'avviso che alti titoli dimostrabili con la fissazione del complemento e con la immunofluorescenza indiretta indichino un'infezione recente. Infatti nell'infezione naturale gli anticorpi dimostrabili con dette metodiche sono già rilevabili a considerevoli titoli nei primi giorni di malattia (entro sette giorni nella maggioranza dei casi) e persistono fino al terzo mese.

Takahashi e Collaboratori (1975) nella infezione sperimentale di vitelli hanno constatato positività alla fissazione del complemento ed alla siero-neutralizzazione dopo sette giorni e Mohanty e Collaboratori (1975) in condizioni analoghe hanno constatato positività alla siero-neutralizzazione da 7 a 14 giorni.

Wellemans e Collaboratori (1978) in vitelli vaccinati con un ceppo di virus attenuato hanno rilevato positività alla fissazione del complemento ed alla immunofluorescenza indiretta già dopo 5-9 giorni dalla vaccinazione, mentre la siero-neutralizzazione è risultata nettamente positiva solo dopo il secondo intervento vaccinale eseguito tre settimane dopo il primo.

Per quanto riguarda infine la presenza degli anticorpi in rapporto all'età vi è concordanza nel rilevare una maggiore incidenza e titoli più alti in animali di età superiore agli otto-dieci mesi. Perrin e Collaboratori (1979) con prove di immunofluorescenza indiretta e di fissazione del complemento hanno osservato che in genere si nota dal secondo al sesto mese di vita dei vitelli un calo del titolo anticorpale, ma gli anticorpi ritornano a livello od aumentano progressivamente entro l'anno di vita. Questo fatto dovrebbe essere in rapporto alla scomparsa degli anticorpi passivi naturali dei neonati ed alla comparsa di quelli conseguenti all'infezione.

In merito però alla presenza di anticorpi nel siero di sangue fetale Gould e Collaboratori (1978) hanno dimostrato con prove di immunofluorescenza indiretta che non vi è relazione fra il titolo degli anticorpi fetali e quello degli anticorpi materni. Ritenendo che in genere gli anticorpi antivirali non passino attraverso la placenta dei bovini ed essendo possibile isolare dai feti il virus Respiratorio Sinciziale, gli Autori ipotizzano che gli anticorpi possano formarsi anche in sede fetale in conseguenza dell'infezione congenita.

In conclusione si può affermare che per le infezioni da virus Respiratorio Sincinziale dei Bovini la ricerca degli anticorpi sierici rappresenta il sistema diagnostico più pratico e valido. Le prove di siero-

neutralizzazione, di fissazione del complemento e di immunofluorescenza indiretta possono essere indifferentemente impiegate. Un solo esame positivo indica la presenza degli anticorpi. La sieroconversione indica l'infezione attiva o recente.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

BERTHIAUME L., JONCAS J., BOULAY G. e PAVILANIS V. (1973) Serological evidence of Respiratory Syncytial Virus infection in sheep. Vet. Rec., 93 - 337.

CARLOTTO F. e CANCELLOTTI F. M. (1978) Eziologia ed epidemiologia delle malattie respiratorie dei bovini - Nota I.: Indagini sierologiche nei confronti dei Reovirus.
Atti Soc. It. di Buiatria, *10* - 321.

CARLOTTO F. e CANCELLOTTI F. M. (1978) Eziologia ed epidemiologia delle malattie respiratorie dei bovini - Nota II.: Indagini sierologiche nei confronti del Virus Respiratorio Sinciziale Bovino.
Atti Soc. It. di Buiatria, *10* - 331.

DELFORGE J. L. e ZYGRAICH N. (1978) Evaluation clinique d'un vaccin vivant atténué pour l'immunisation des bovins contre le Virus Respiratoire Syncytial.
Ann. Méd. Vét., *122* - 545.

EDINGTON N. e JACOBS J. W. (1970) Respiratory Syncytial Virus in cattle.
Vet. Rec., 87 - 762.

ESPINASSE J., LE LAYEC C. e FAYE P. (1978) Hémagglutination passive: application de la methode au diagnostic sérologique des affections respiratoires virales des jeunes bovins.
Rec. Méd. Vét., *154* - 227.

GOULD E. A., ALLAN G. M., LOGAN E. F. e MC FERRAN J. B. (1978) Detection of antibody to Bovine Syncytial Virus and Respiratory Syncytial Virus bovine fetal serum.
J. Clin. Microbiology, *8* - 233.

HALENEV G. A. e GUNENKOV V. V. (1977) Accertamento diagnostico dell'infezione causata nei bovini dal Virus Respiratorio Sinciziale.
Rec. in Selezione Veterinaria, 1979, *20* - 189.

INABA e Coll. (1972) citati da Wellemans e Leunen (1975) l.c.

JACOBS J. W. e EDINGTON N. (1971) Isolation of Respiratory Syncytial Virus from cattle in Britain.
Vet. Rec., *88* - 694.

LEHMKUHL H. D. e GOUGH P. M. (1977) Investigation of causative

agents of bovine respiratory tract disease in a beef cow-calf herd with an early weaning program.
Am. J. Vet. Res., *38* - 1717.

MAGLIONE E. (1977) Diagnostica sierologica delle infezioni virali respiratorie del bovino.
Atti Soc. It. di Buiatria, *9* - 54.

MOHANTY S. B., INGLING A. L. e LILLIE M. G. (1975) Experimentally induced Respiratory Syncytial Viral infection in calves.
Am. J. Vet. Res., *36* - 417.

PACCAUD M. F. e JACQUIER C. (1970) A Respiratory Syncytial Virus of bovine origin.
Arch. ges. Virusforsch., *30* - 327.

PERRIN B., DANNACHER G. e SOLSONA M. (1979) Mise en évidence des anticorps contre le Virus Respiratoire Syncytial chez les Bovins français.
Rec. Méd. Vét., *155* - 465.

POTGGIETER L. N. D. e ALDRIDGE P. L. (1977) Use of the indirect fluorescent antibody test in the detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus antibodies in bovine serum.
Am. J. Vet. Res., *38* - 1341.

ROSENQUIST B. D. (1974) Isolation of Respiratory Syncytial Virus from calves with acute respiratory disease.
J. Inf. Dis., *130* - 177.

ROSSI C. R. e KIESEL G. K. (1974) Serologica levidence for the association of Bovine Respiratory Syncytial Virus with respiratory tract disease in Alabama cattle.
Inf. Imm., *10* - 293.

ROSSI C. R. e KIESEL G. K. (1977) Bovine Respiratory Syncytial Virus infection of bovine embryonic lung cultures: a kinetic study by the fluorescent antibody technique.
Am. J. Vet. Res., *38* - 1901.

ROSSI C. R. e KIESEL G. K. (1978) Bovine Respiratory Syncytial Virus infection of bovine embryonic lung cultures: enhancement of infectivity with diethylaminoethyl-dextran and virus-infected cells.
Arch. Virology, *56* - 227.

SMITH M. H., FREY M. L. e DIERKS R. E. (1975) Isolation, craracterization and pathogenicity studies of a Bovine Respiratory Syncytial Virus.
Arch. Virology, *47* - 237.

TAKAHASHI E., INABA Y., KUROGI H., SATO K., GOTO Y. e OMORI T. (1975) Diagnosis of Bovine Respiratory Syncytial Virus infection by complement fixation test.
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., *15* - 179.

VAN DER MAATEN M. J., HUBBERT W. T., BOOTHE A. D., BRYNER J. H. e ESTES P. C. (1973) Isolations of Bovine Syncytial Virus from maternal and fetal blood.
Am. J. Vet. Res., *34* - 341.

VAN DER MAATEN M. J., MALMQUIST W. A. e CHEVILLE N. F. - (1972) Susceptibility of calves to Bovine Syncytial Virus given by different inoculation routes.
Am. J. Vet. Res., *33* - 1157.

WELLEMANS G. (1977) Laboratory diagnosis methods for Bovine Respiratory Syncytial Virus.
Vet. Science Comm., *1* - 179.

WELLEMANS G. e LEUNEN J. (1971) L'importance du virus V 220/69 dans les troubles respiratoires des veaux en Belgique.
Ann. Méd. Vét., *115* - 35.

WELLEMANS G. e LEUNEN J. (19755) Le Virus Respiratoire Syncytial et les troubles respiratoires des bovins.
Ann. Méd. Vét., *119* - 359.

WELLEMANS G., LEUNEN J. e LUCHSINGER E. (1970) Isolement d'un virus (220/69) serologiquement semblable au Virus Respiratoire Syncytial Humain.
Ann. Méd. Vét., *114* - 89.

WELLEMANS G. e VAN OPDENBOSCH E. (1978) Vaccination des bovins contre le Virus Respiratoire Syncytial (RSB) au moyen d'une souche atténuée. B.: epreuves d'éfficacité.
Ann. Méd. Vét., *122* - 537.

WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E., BOUCQUE C. V., LEUNEN J. e STROBBE R. (1978) Vaccination des bovins contre le Virus Respiratoire Syncytial (RSB) au moyen d'une souche atténuée.
Ann. Méd. Vét., *122* - 527.

WELLEMANS G., VAN OPDENBOSCH E. e DE KEGGEL D. (1979) La neutralisation de l'immunofluorescence indirecte (NIFI): une technique spécifique et quantitative pour la mise en évidence d'antigènes viraux.
Ann. Méd. Vét., *123* - 185.

WOODE G. N. (1972) Isolation of Bovine Syncytial Virus in Britain.
Vet. Rec., *91* - 363.

WOODS G. T. (1974) Bovine Parvovirus 1, Bovine Syncytial Virus, and Bovine Respiratory Syncytial Virus and their infections.
Advances in Vét Science a. Comp. Méd., *18* - 273.

L. SIDOLI e G. BARIGAZZI

ACCERTAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DELLA FLORA DI COMPLICAZIONE IN CORSO DI SINDROME RESPIRATORIA DEI BOVINI

Premessa

Esami necroscopici, batteriologici, sierologici e prove biologiche eseguite su topini, cavie, conigli ed uova embrionate di pollo costituiscono l'ampio ventaglio di mezzi di cui il laboratorio diagnostico veterinario si avvale per offrire al clinico il suo contributo alla diagnosi di malattia batterica.

Tempestività di esecuzione ed attendibilità sono i requisiti principali ai quesiti diagnostici del clinico. Ricordiamo inoltre che il materiale che viene inviato al laboratorio è costituito in massima parte da animali deceduti e solo in minima da animali sacrificati: esiste la eventualità, dunque, di una conservazione imperfetta che si riflette sull'attendibilità dell'esito. La scelta del materiale da inviare, costituita da animali interi od organi di essi, da essudati, ecc., deve perciò essere accurata, completa e ben eseguita.

Va ricordato inoltre che altrettanto corretta e completa deve essere la documentazione relativa alla situazione clinica rilevata in allevamento poiché essa può orientare il laboratorio sulla ricerca da eseguire con risultato di notevole risparmio di tempo e di mezzi.

Il materiale ideale per il laboratorista è costituito dall'animale integro (fatta eccezione per quelli di grossa mole), spedito secondo rigorose norme igieniche, ben conservato e, se possibile, in più di un esemplare (ripetibilità diagnostica, mosaico batterico, ecc.).

Strategia di accertamento e metodiche

Dopo questa breve ma necessaria premessa siamo dell'avviso che l'accertamento della presenza di microorganismi patogeni in corso di

sindrome respiratoria in un allevamento, deve essere eseguita seguendo due distinte direttive, utilizzando:

a) campioni di materiale patologico prelevati da animali vivi (nel caso non siano avvenuti decessi) quali sangue, essudato delle mucose nasali e congiuntivali;

b) animale o animali morti o in stato preagonico, oppure testa, trachea ed organi toracici completi.

A commento aggiungiamo che il sangue risulta di scarso valore per il batteriologo veterinario ed i motivi che ne limitano l'impiego sono in massima parte costituiti dalle difficoltà di esecuzione del prelievo «sterile», dalla scomparsa rapida dei batteri dal circolo in caso di setticemia, dalla esecuzione prima di ogni e qualsiasi terapia. Per contro, l'essudato delle mucose nasali, prelevato con tampone sterile, permette isolamenti interessanti quali Micoplasmi, Pasteurelle, Salmonelle. Meno importante risulta l'essudato congiuntivale: esso può essere utile, ad esempio, per la ricerca di *Moraxella bovis* in corso di sindrome respiratoria associata al «Pink eye».

Il prelievo a mezzo tamponi, che deve necessariamente essere eseguito in allevamento, prevede una preventiva ed accurata pulizia detergente delle narici con cotone idrofilo e soluzione fisiologica sterile seguito dalla delicata introduzione in esse del tampone con senso rotatorio per raccogliere gli essudati. L'invio del campione al laboratorio deve essere rapido o previa conservazione a 4°C.

Per stabilire una correlazione tra metodo diagnostico applicato e risultati ottenuti abbiamo convenuto di descrivere gli esami che si eseguono routinariamente in un laboratorio veterinario «tipo», limitando inoltre il nostro interesse ad un ristretto numero di casi insorti durante l'anno in corso. Sono state operate quindi precise scelte ed altrettanto precise omissioni sulla quantità e sulla qualità dei metodi e dei mezzi diagnostici.

MICROORGANISMI PATOGENI ISOLATI IN CORSO DI SINDROME RESPIRATORIA NEI BOVINI

In ordine di frequenza essi sono:

Pasteurella multocida
Corynebacterium pyogenes

Mycoplasma spp.
Miceti
Pasteurella haemolytica
Streptococcus spp.
Salmonella spp.
E. coli
Staphylococcus aureus

La ricerca di Clamidie è stata eseguita limitatamente a 15 casi.

TABELLA 1

ACCERTAMENTO DIAGNOSTICO IN CORSO DI SINDROME RESPIRATORIA A MEZZO TAMPONI NASALI

Tamponi	Episodi	Pasteurella m.	Streptococchi	E. coli	Pasteurella h.	Micoplasmi	Salmonella
106	9	46,66%	16,66%	11,66%	6,66%	5%	3,33%

TABELLA 2

ACCERTAMENTO DIAGNOSTICO IN CORSO DI SINDROME RESPIRATORIA SU ORGANI PROFONDI DELL'APPARATO RESPIRATORIO

Episodi	Pasteur. multocida	Coryneb. pyogenes	Micoplasmi	Miceti	Salmonella	Pasteurella haemolytica	Streptococchi	E. coli	Stafilococchi	Clamidie
34	52,94%	32,25%	20,58%	14,7%	11,76%	11,76%	8,82%	2,94%	2,94%	0

TABELLA 3

ACCERTAMENTO SU ANIMALE VIVO MEDIANTE USO DI TAMPONI NASALI O CONGIUNTIVALI

Terreno di semina	Incubazione			Subcoltura	Isolamento
	atmosfera	T	tempo		
agar Sabourand o agar siero	normale	25-37°C	24-72 h		*Aspergillus* spp., *Penicillum* spp., *Candida*
agar sangue	normale	37°C	24-48 h		*Pasteurella m., Pasteurella h., Salmonella,* Streptococchi, Stafilococchi, *E. coli*
agar sangue	+ 10% CO_2	37°C	24-48 h		*C. pyogenes*
brodo tetrationato secondo Preuss	normale	37°C	18 h	agar Gassner	Salmonella, E. coli
agar Gassner agar Mc Conkey	normale	37°C	24 h		Salmonella, E. coli
Yoder liquido + siero equino + batteriostatici	normale	37°C	5 gg	Yoder solido in 10% CO_2 per 3 - 5 gg	Micoplasmi

TABELLA 4

ACCERTAMENTO DAGLI ORGANI RESPIRATORI PROFONDI da effettuarsi mediante semina di: essudati tracheale, bronchiale e pleurico, pus, parenchima polmonare, linfonodi mediastinici

Terreno di semina	Incubazione			Subcoltura	Isolamento
	atmosfera	T	tempo		
agar sangue o agar siero	normale	25-37°C	24-48 h		*Pasteurella m., Pasteurella h.,* Streptococchi Stafilococchi
agar sangue	+ 10% CO_2	37°C	24-48 h		*C. pyogenes*
agar Gassner	normale	37°C	24 h		*Salmonella, E. coli*
agar Sabouraud	normale	37°C	24-72 h		Miceti
brodo siero	normale	37°C	24 h		Streptococchi
Yoder liquido + siero equino + batteriostatici	normale	37°C	5 gg	Yoder solido in 10% CO_2 per 3-5 gg	Micoplasmi

Inoltre:

Inoculazione di uova embrionate di 6-7 giorni, via sacco vitellino, per ricerca Clamidie.
Eventuale ricerca delle sostanze inibenti in caso di mancato isolamento..
Eventuale prova biologica su topino per evidenziare *Pasteurella multocida.*

Pasteurella multocida

Cresce in 24 ore a 37°C su agar siero od agar sangue. Il terreno assume, nell'area di sviluppo della patina o delle colonie, colorazione scura tanto più visibile quanto più la semina è stata abbondante.

Osservando le colonie con luce a diversa incidenza mediante microscopio stereoscopico si possono apprezzare colonie: mucoidi, liscie iridescenti, liscie non iridescenti e rugose. Morfologicamente si presentano come coccobacilli ovoidali; si possono però osservare anche forme filamentose. Assume una caratteristica colorazione bipolare che si perde facilmente nelle subcolture e che si osserva più chiaramente colorando con eosina e bleu di metilene. Talvolta si osserva la presenza di capsule. È immobile in agar semisolido e non cresce sull'agar McConkey.

Produce indolo e nei confronti degli idrati di carbonio, tra gli altri, fermenta glucosio, saccarosio e mannitolo, e non il lattosio.

È patogena per il coniglio e per il topino; quest'ultimo in particolare, inoculato sottocute od in peritoneo con brodocoltura di 24 ore, viene a morte in 8-12 ore.

Corynebacterium pyogenes

Sull'agar sangue dopo 24 ore ha una scarsa crescita, più abbondante entro le 48 ore. Caratteristicamente beta-emolitico, la colonia è grigia, con diametro di mm. 1. Temperatura ottimale di crescita 37°C, più rigogliosa in atmosfera arricchita del 10% di CO_2.

Corti coccobacilli o bastoncini Gram positivi della lunghezza di due micron raccolti in mazzette o ammassi. Possono decolorarsi e presentare grande numero di elementi Gram negativi nelle colture invecchiate. È un microorganismo proteolitico: fluidifica il siero solidificato in 48-72 ore creando una caratteristica depressione del terreno attorno alle colonie. Non produce catalasi al contrario di tutti gli altri Corinebatteri tranne *C. suis* che non è emolitico ed è strettamente anaerobio.

Normalmente non si ricorre alle prove biologiche.

Crescono bene su terreni liquidi nei quali si rivelano con una opacità solo indicativamente accettabile. Le colonie che compaiono su terreni solidi sono emisferiche, appiattite, piccole (∅ 10-600 μ.). La colonia tipica è bifasica, con aspetto ad «uovo fritto», dotata di un'area centrale opaca e granulare che cresce sotto la superficie dell'agar, ed una zona periferica traslucida. Frequente la crescita di colonie «T» (*Tiny*). Numerose specie sono anaerobie facoltative ma il 10% di CO_2 nell'atmosfera di crescita favorisce il loro sviluppo. In mancanza di adatto termostato offre discreti risultati pratici l'uso del «vaso con candela».

Insensibili alla Penicillina (100-10.000 microgrammi/ml. di sospensione) che viene usata quale antibatterico nei mestrui da inoculare nei vari substrati di isolamento. Variamente sensibili ad altri antibiotici: indicativo il fatto che ci è occorso di isolarli su uova embrionate da tessuti trattati con streptomicina e vancomicina (5 e 1 mg./ml. di sospensione) in corso di ricerca di Clamidie.

Tutte le specie di Micoplasmi richiedono per la crescita la presenza nei terreni sintetici di steroli, a differenza degli Acoleplasmi. È sempre rigorosamente necessario differenziarli dalle «forme L» dei batteri.

Morfologia cellulare: l'assenza di una parete, sostituita da una membrana a tre strati, rende questi microorganismi privi di rigidità e dona loro una caratteristica plasticità. Conseguentemente essi si presentano durante le fasi del loro ciclo vitale, sotto forme di aspetto bizzarro, altamente pleomorfe: variano da sferiche o leggermente ovali (∅ 0,2-1,5 μ.) nella prima fase di crescita esponenziale, a filamenti con fini ramificazioni; catene di corpi coccoidi, ad anello o a stelline si sviluppano nella seconda fase di crescita. Gram negativi, si colorano delicatamente usando GIEMSA o MACCHIAVELLO; il loro riconoscimento è frutto di lunga esperienza.

La tecnica usata per l'isolamento prevede la semina del materiale patologico in terreno liquido (Yoder) arricchito di siero equino e penicillina e l'incubazione a 37°C per 5 giorni; il successivo trapianto del sedimento ottenuto previa centrifugazione su terreno solido ugualmente arricchito, ed incubato per 3-5 giorni a 37°C in atmosfera umida addizionata del 10% di CO_2. Colonie singole, isolate, con mor-

fologia caratteristica si trapiantano in terreno liquido senza batteriostatici e senza siero; dopo 5 giorni di incubazione a 37°C si allestiscono colture solide con steroli e senza steroli per la differenziazione con gli Acoleplasmi e le «forme L» dei batteri. I Micoplasmi crescono solamente su terreno provvisto di steroli.

Salmonelle

Crescita sui terreni arricchiti o meno in 18-24 ore. Per l'isolamento in laboratorio si usano quasi esclusivamente terreni selettivi con batteriostatici e rivelatori di pH, che sfruttano l'incapacità delle Salmonelle di fermentare il lattosio e permettono lo sviluppo di colonie caratteristicamente colorate: agar desossicolato-citrato (DCA) e agar verde brillante (VBA) crescita di colonie rosa-rosse; agar Salmonella - Shigella (SS) crescita di colonie incolori col centro nero; agar Gassner crescita di colonie gialle.

Nella tecnica di isolamento, a volte, si preferisce passare prima attraverso un terreno di arricchimento (brodo tetrationato secondo Preuss, brodo selenite) per 24 h, da trapiantare successivamente su di un terreno selettivo all'agar. Dopo una incubazione di 24 h. a 37°C si possono apprezzare le colonie di 1-3 mm. di diametro. Bastoncini Gram negativi, mobili e pleomorfi.

Per l'identificazione si ricorre alla semina per infissione e striscio sul terreno di Kligler-becco di clarino, che deve apparire col becco di clarino rosso ed il fondo giallo-nero. Successivamente, dopo una eventuale prova di agglutinazione rapida su vetrino con siero poliagglutinante, è sufficiente ricorrere a tre semplici prove: produzione di indolo, di ureasi e di beta-galattosidasi, prove che nel caso della Salmonella risultano negative.

Pasteurella haemolytica

Cresce normalmente su agar sangue formando in 24-48 ore colonie umide e traslucide. Aerobio facoltativo. Debolmente beta-emolitico, tale carattere si perde facilmente nelle subcolture; la zona emolizzata è chiaramente visibile e varia secondo i globuli rossi utilizzati. Gram negativo, morfologicamente simile a *Pasteurella multocida.*

Abbiamo rilevato la quasi costante presenza, in tutti i ceppi isolati, di grosse capsule, che se non ne rappresentano un carattere distintivo nei confronti della maggior parte delle altre Pasteurelle, ne costituiscono quanto meno una grossa caratteristica. Appaiono microscopicamente sotto l'aspetto di cellule rigonfie, globose, fortemente pleomorfe e colorate in modo non uniforme. Cresce sul terreno di McConkey, fermenta glucosio, saccarosio e mannitolo, non il lattosio ed è indolo negativa. Non è patogena per il topino e per il coniglio se inoculati per via s. c. ed i. p. benché si isoli da organi di essi se sacrificati entro 48 ore dall'inoculazione. Non patogena per il coniglio se inoculata e. v. con brodocoltura di 24 ore. Patogena per il topino se inoculata per via e. c.

Streptococchi

Crescono in 24 h. su ordinari terreni di coltura liquidi e solidi, ma l'aggiunta di siero o di sangue o di idrati di carbonio fermentabili ne favoriscono lo sviluppo. Temperatura ottimale: da 37°C a 42°C fino a 45°C (ceppi termofili). Le colonie appaiono circolari, grigie, del diametro di circa 1 mm. Alcune colonie appaiono mucoidi od opache, carattere questo, anche se non costante, di ceppi virulenti.

Morfologia: cellule sferiche od ovoidi in paia od in catene di varia lunghezza, tetradi particolarmente apprezzabili in brodo siero equino; diametro di circa 1 μ.; immobili o raramente mobili. Non formano spore. Gram positivi, nelle vecchie colture tendono a decolorare facilmente diventando Gram limite. Occasionalmente sono dimostrabili capsule in primo isolamento. È descritta una fase L.

Presentano capacità emolitiche, ma tale qualità può variare da un ceppo all'altro e risentire delle variazioni delle condizioni di crescita, includendo il tipo del sangue usato od il peptone del terreno, lo spessore dell'agar e la tensione di ossigeno dell'atmosfera nella quale sono coltivati. Per uniformità di risultati si usano terreni contenenti sangue di equino, sui quali si ottengono i seguenti tipi di reazioni emolitiche:

Beta-emolisi: riferita ad una zona limitata o larga di completa emolisi attorno ad una colonia;

Alfa-emolisi primaria ed alfa emolisi.

Il termine «streptococchi emolitici», in ogni caso, si riferisce usualmente agli organismi che producono beta-emolisi.

Le reazioni biochimiche sono di secondaria importanza.

E. coli

In brodo la crescita è denunciata da intorbidamento diffuso entro 18 ore, con deposito abbondante che si disperde con l'agitazione della provetta (forma «S»); la formazione di un supernatante ed un deposito granulare che non si disintegra con l'agitazione denunciano la fase «R».

Aerobio, anaerobio facoltativo. Cresce su ordinari terreni di coltura senza aggiunta di sangue, siero ecc.

Temperatura ottimale 37°C. Si sviluppa bene da 20°C a 44°C.

Il terreno in uso nei nostri laboratori è l'agar Gassner: tutti i ceppi fermentano lattosio e glucosio con produzione di acido. Utile pure il terreno di Mc Conkey. La caratteristica proprietà emolitica di alcuni ceppi è svelata con l'uso dell'agar sangue.

Morfologicamente si presenta come un bastoncino Gram negativo che può essere mobile per flagelli peritrichi, o immobile. Non forma spore. Alcuni ceppi sono dotati di capsule e su terreni solidi formano colonie mucoidi.

La modesta percentuale di casi di sindrome respiratoria nei quali è coinvolto come agente di complicazione ci dispensa da ulteriori nonotizie.

Stafilococchi

Gli stafilococchi crescono sui più semplici terreni di coltura. Caratteristicamente emolitici; l'emolisi si apprezza in agar contenente globuli rossi di pecora, di vitello o di coniglio dopo una incubazione di 24 ore a 37°C con colonie di 2-4 mm. di diametro, talvolta pigmentate di giallo. Crescono in atmosfera normale, ma è ben tollerata anche una atmosfera arricchita di CO_2, condizione che meglio evidenzia le loro proprietà emolitiche. I ceppi patogeni (*Staph. aureus*) posseggono vari enzimi e tossine, nonché tre emolisine distinte (α, β, δ) che possono combinarsi assieme o essere presenti singolarmente nei vari ceppi. Crescono bene su terreni ipertonici (7,5% NaCl). Terreno se-

lettivo è quello di Baird-Parker contenente: tellurito di potassio (agente selettivo), glicocolla e piruvato (metaboliti che permettono la crescita rapida dello Stafilococco) e rosso d'uovo, i cui lipidi vengono idrolisati da una lecitinasi presente negli Stafilococchi patogeni, producendo un alone chiaro di 2-5 mm. attorno alla colonia di colore nero.

Morfologicamente si presentano come cocchi Gram positivi di circa 1 μ. di diametro. Appaiono preferibilmente come ammassi o grappoli, specialmente in preparati allestiti da brodocolture, ma si possono anche osservare elementi singoli, in paia od in tetradi. Sono immobili e non formano spore.

La «Coagulasi» dimostrabile su plasma di coniglio è sufficiente al riconoscimento dei ceppi patogeni.

Clamidie

Microorganismi Gram negativi, immobili, che si moltiplicano solamente su cellule viventi; visibili al microscopio ottico, 300 nm. di grandezza, dotati di RNA - DNA, sensibili all'azione di determinati antibiotici.

Il loro modo di moltiplicazione è caratterizzato dalla trasformazione dei *corpi elementari* (piccole forme infettanti a parete rigida) in *corpi iniziali* (forme più grandi a parete sottile, non infettanti); il corpo elementare è capace di sopravvivere per il tempo di un breve viaggio extracellulare da una cellula all'altra. Non è in grado di moltiplicarsi nella cellula nella quale si è formato.

Le Clamidie si colorano con metodi tintoriali quali Macchiavello, Gimenez e Castaneda. Si coltivano su uova embrionate di pollo, su monostrati cellulari, su animali da esperimento.

La tecnica di isolamento su uova embrionate, utilizzabile in qualsiasi laboratorio da tecnici preparati, prevede l'uso di uova SPF, di giorni 6-8, da inoculare per la via del sacco vitellino con sospensioni di polmone addizionate con certi antibiotici ed antifungini quali: Streptomicina, Vancomicina, Neomicina, Nistatina ed Anfotericina B i quali sono inattivi verso le Clamidie e svolgono attività antibatterica. Le uova devono essere «sperate» due volte al giorno; tempo di osservazione 14 giorni. La morte degli embrioni entro 48 ore è da ritenersi aspecifica. Gli embrioni morti nelle ore successive vengono

controllati al microscopio previa colorazione, con metodo di Gimenez, Macchiavello o Castaneda, di impressioni su vetrino di frammenti di membrana del sacco vitellino. I corpi elementari, endocitoplasmatici o liberi per lisi cellulare, sono colorati, col Gimenez, in rosa su fondo verde, col Macchiavello in rosso su fondo bleu e con Castaneda in bleu su fondo rosa.

Un frammento di membrana del sacco vitellino di ogni embrione morto deve sempre essere utilizzato per ricerche di controllo batteriologico nei riguardi di Micoplasmi, batteri e muffe.

In caso di sopravvivenza di tutti gli embrioni sono necessari uno o due passaggi ciechi per considerare negativa la ricerca.

Risultati e conclusioni

Per rappresentare nel modo più semplice uno schema di condotta per l'accertamento in laboratorio di microorganismi associati a «sindrome respiratoria», abbiamo predisposto delle Tabelle (N. 3 - N. 4), mentre un brevissimo commento, dimensionato al ricorso al minor numero di esami tra i più altamente probanti, ci è sembrato utile come traccia guida per la identificazione di ciascun isolato, ben sapendo con ciò di distaccarci dal perfezionismo che caratterizza la microbiologia, pur di orientarci a fornire risposte in tempi brevi al Clinico.

Tranne rare eccezioni, l'isolamento di patogeni dall'albero respiratorio non offre soverchie difficoltà tecniche.

I tempi di risposta sono contenuti entro 72-96 ore, astrazion fatta per i Micoplasmi che richiedono tempi tecnici superiori a 9 giorni e per le Clamidie che possono richiederne oltre 40. Le eccezioni alla norma sono ordinariamente rappresentate dalle colture risultate sterili: ciò impone la ricerca di «sostanze inibenti» la cui presenza è possibile per pregresse terapie individuali o di massa, e la prova biologica su animali di laboratorio specie nei confronti di *Pasteurella multocida.*

Raramente polmoni indenni da lesioni macroscopiche permettono l'isolamento di microorganismi di sorta; ciò si verifica invece spesso per trachea e cavità nasali.

Un breve commento alle Tabelle N. 1 - N. 2: *Pasteurella multocida* domina sia il risultato dei tamponi nasali che degli organi pro-

fondi. È abbastanza singolare il radicale mutamento della flora più rappresentata nella prima tabella rispetto alla seconda. Infatti, mentre nella prima gli Streptococchi ed i Coli seguono il risultato più importante, essi scompaiono quasi nella seconda, sostituiti dai più «specifici» *C. pyogenes,* Micoplasmi, Miceti e *Pasteurella haemolytica.*

A proposito della diffusa opinione secondo la quale certi patogeni quali *Pasteurella* spp. e *Mycoplasma* spp. partecipano alla «normale» flora microbica delle prime vie respiratorie, abbiamo eseguito «a latere» una limitata ricerca proprio tesa alla verifica di una ipotesi che, se vera, annulla quanto meno l'uso del tampone nasale quale strumento d'indagine per la ricerca di agenti presunti patogeni. I risultati ottenuti starebbero infatti ad indicare che la presenza di *Pasteurella* spp. e Micoplasmi è dimostrabile in alta percentuale di individui appartenenti ad allevamenti nei quali si è osservata o è presente una sintomatologia a localizzazione respiratoria, pur limitata a rinite di vario grado, ma non la è laddove lo stato sanitario non denuncia malattie respiratorie. In altri termini i tamponi nasali eseguiti su n. 50 vitelli appartenenti ad aziende a «ciclo chiuso» particolarmente noti sotto il profilo sanitario, hanno dimostrato solo la presenza di Streptococchi e di *E. coli.* Ciò stimola ad una più approfondita ricerca particolarmente rivolta a dimostrare l'attività delle difese immunitarie locali e generali degli animali, in correlazione al tipo di allevamento e di ambiente in cui essi vivono.

Globalmente i nostri risultati rispecchiano quelli di analoghe indagini svolte in Italia ed in Stati europei ed extraeuropei.

Sotto il profilo strettamente tecnico, nulla vi è da dire sull'isolamento di *Pasteurella multocida* e *C. pyogenes.*

Le Salmonelle, specie i sierotipi *thyphimurium, enteritidis* e *dublin,* risultano sempre più frequentemente responsabili di localizzazioni rinopolmonari in giovani vitelli di ogni tipo di allevamento. Ciò crea possibili e frequenti errori diagnostici che possono tuttavia essere facilmente evitati ricorrendo all'esame batteriologico degli essudati nasali.

Pasteurella haemolytica ci pare il più estroso dei microorganismi isolati, sia per le sue peculiari caratteristiche morfologiche e colturali, che per le responsabilità di ordine patologico. Morfologicamente dotata di abbondante presenza di capsule, di aspetto pleomorfo con caratteri tintoriali variabili, essa si isola frequentemente dalle cavità

nasali e da casi di setticemia emorragica che, ordinariamente, è considerata forma rara; il quadro anatomo-patologico che sostiene risulta dominato da ampi panni fibrinosi in sede pleurica ed interlobulare, emorragie alle sierose e da una gravissima linfoadenite emorragica in cui i linfonodi specie retromascellari, mediastinici e meseraici risultano a volte ingrossati sino a raggiungere le misure di un uovo di tacchino.

I Micoplasmi, oltre a rappresentare difficoltà di isolamento (si può presumere una più alta percentuale), costituiscono per la maggior parte dei laboratori la grave limitazione della difficoltà di identificazione, tanto che normalmente la risposta si limita a «presenza Micoplasmi». I miceti sono facilmente identificati attraverso meticolosi esami microscopici «a fresco». Esami batteriologici positivi debbono essere valutati con cautela; molto autorevole è il responso dell'esame istologico. Alcuni ceppi da noi isolati ripetutamente dagli stessi organi, sono stati classificati presso l'Istituto Zooprofilattico del Piemonte (che qui ringraziamo) come muffe del genere *Aspergillus* e *Penicillium* unanimemente considerate le più frequenti. Questi patogeni debbono essere tenuti in grande considerazione specie nei casi di prolungata terapia con antibiotici poiché sono frequentemente causa essi stessi della morte dell'animale.

Il rinnovato interesse per le Clamidie quali agenti responsabili di polmoniti sia nei bovini giovani che adulti, ci ha spinti ad intraprendere una ricerca limitata a 15 casi. Essa è stata eseguita sul solo polmone a causa dell'alto numero di microorganismi presenti nelle secrezioni nasali. La ricerca è stata eseguita usando per substrato uova embrionate di pollo di 6 gg. di incubazione, SPF, per inoculazione attraverso la via del sacco vitellino, previo trattamento dell'inoculo con Vancomicina (1 mg./ml.) e Streptomicina (5 mg./ml.). I risultati sono stati inconcludenti. Infatti da 4 casi si è avuto l'isolamento di Micoplasmi, *Pasteurella haemolytica* e *C. pyogenes* già ottenuto nel corso dell'esame batteriologico. Nei casi rimanenti le uova sono state controllate due volte al giorno sino al 14° gg. post-inoculazione ed è stato eseguito un solo passaggio cieco per ognuno di essi, con esito negativo. Impressioni di superfici di taglio di parenchima polmonare sede di lesione, colorate con il metodo di Giemsa e Macchiavello, non hanno permesso l'osservazione di corpi riferibili a «corpi elementari» di Clamidie. Tale modesto contributo di ricerca ha in

ogni caso offerto un suo positivo risultato: ha suggestivamente confermato la validità del metodo colturale nello svelare con precisione ed attendibilità la presenza di microorganismi patogeni dai visceri animali; ha riconfermato il ruolo dell' «uovo embrionato» quale prezioso e sensibile substrato colturale, ha dimostrato la già nota variabile sensibilità dei micoplasmi all'attività di determinati antibiotici, ha dimostrato inoltre la ridotta possibilità di isolare Clamidie da tessuti contaminati da microorganismi dotati di forte potere patogeno nei confronti dell'embrione di pollo e poco sensibili ad antibiotici che non svolgono attività nei confronti di Clamidie e, infine, ha confermato che come metodo diagnostico per la ricerca di Clamidie richiede tempi eccessivamente lunghi ed impegno notevole.

Si conclude nell'affermare che l'esame batteriologico costituisce elemento indispensabile nella diagnostica delle malattie dell'apparato respiratorio anche se non esclusivo, e nell'indicare nei tamponi nasali un valido ausilio per la formulazione di una diagnosi presuntiva pur con le difficoltà di interpretazione che essa comporta.

C. ROSSI

CRITERI DI SELEZIONE DEI VACCINI CONTRO LE INFEZIONI RESPIRATORIE DEL BOVINO E RELATIVO IMPIEGO

Affinché la vaccinazione contro le infezioni respiratorie del bovino dia risultati soddisfacenti occorre prendere in considerazione i vari fattori che possono influenzarne l'attività.

In particolare occorre tener presente:

a) *gli agenti patogeni,* virali e/o batterici che predominano nell'allevamento o nella zona;

b) *i fattori ambientali,* in particolare il tipo di allevamento, la presenza o meno dell'infezione in atto, il superaffollamento (crowding) e gli altri stress che, ripercuotendosi specialmente a livello della superficie respiratoria, determinano una depressione del metabolismo cellulare con conseguente abbassamento dei livelli di produzione delle immunoglobuline superficiali (Ig A);

c) *l'età,* in quanto la presenza di anticorpi materni può interferire con il tipo di vaccinazione utilizzata.

Per superare l'incidenza di questi elementi, potremmo disporre di vari tipi di vaccino che consideriamo nei due gruppi di spenti o vivi e attenuati.

— monovalenti virali: allestiti con un solo tipo di virus;

— polivalenti virali: allestiti con due o più tipi di virus, quali il virus della rinotracheite inf. (IBR), della parainfluenza (PI 3), adenovirus (BAV 3), reovirus, virus della diarrea virale - malattia delle mucose (BVD);

— polivalenti misti: allestiti con più tipi di virus in associazione ed agenti batterici di infezioni polmonari quali *Past. multocida, Past. haemolytica,* microplasmi, clamidie, stafilocchi, streptococchi ecc.

Le sostanze inattivanti più comunemente utilizzate sono la formalina, il beta-propiolattone, il tetracloroetilene, la glutaraldeide.

Quali adiuvanti vengono usati l'idrossido di alluminio, le sostanze oleose, il sodio alginato, la saponina.

Anche per i *vaccini vivi attenuati* si può disporre di vaccini monovalenti o polivalenti, che possono essere usati per iniezione o per via endonasale.

L'attenuazione può essere ottenuta attraverso passaggi seriali in colture cellulari, creando ceppi resistenti alla temperatura di 56°C, oppure con i cosiddetti ceppi mutanti termosensibili o termospecifici (mutanti TS).

Questi hanno la particolarità di moltiplicarsi bene ad una temperatura relativamente bassa (ad es. alla temperatura permissiva di 35°-36°C) ma non a temperature più elevate (ad es. temperatura restrittiva di 39°C) mentre il tipo originale si moltiplica bene alle due temperature. Tali mutanti subiscono anche una diminuzione o perdita della virulenza, per cui si è passati all'applicazione per la vaccinazione contro le infezioni respiratorie dell'uomo e degli animali per via endonasale. Il principio consiste nel fatto che le mutanti TS possono ancora moltiplicarsi nelle prime vie respiratorie a temperatura permissiva, mentre non possono moltiplicarsi nelle vie respiratorie profonde o in altri organi interni, ove la temperatura è restrittiva. La moltiplicazione dei virus TS nelle prime vie respiratorie non provoca la malattia, ma la comparsa di una immunità locale, nonché di anticorpi circolanti e di interferon. Inoltre, essendo somministrati a livello delle mucose, non subirebbero effetti inibitori nel loro sviluppo da anticorpi colostrali.

La mutante TS del virus IBR non presenterebbe i pericoli di altri tipi di virus IBR attenuati, di infettare le vacche gravide non vaccinate provocando aborti.

I *vaccini spenti* sono, sotto questo aspetto, completamente innocui, e gli eventuali inconvenienti potrebbero essere legati ad incidenti di tipo anafilattico. La componente pasteurellare nei vaccini morti, può essere causa di reazioni per shock da endotossine; questa reazione è passeggera ed è più grave nei vaccini contro la sola pasteurellosi. Infatti combinato con vaccini virali l'antigene da pasteurelle provoca reazioni minori e si comporta come sostanza adiuvante con-

tribuendo a dare una più elevata risposta anticorpale nei confronti della componente virale (Larson e Schell).

I criteri coi quali si possono selezionare i vaccini devono tener conto dei vari elementi finora citati affinché il programma di profilassi abbia un'applicazione mirata.

L'intervento d'urgenza in allevamenti con infezione in atto presenta un'evidente controindicazione, sia perché può aggravare le manifestazioni cliniche, sia per l'inutilità della vaccinazione che crea sfiducia nell'allevatore. Ciò non toglie che, se l'infezione è iniziale e ha colpito solo pochi capi, con un intervento d'urgenza si possono ottenere buoni risultati, specie utilizzando contemporaneamente un vaccino vivo e uno spento.

Tale tipo di vaccinazione è pure indicata allorché occorre intervenire su vitelli molto giovani che entrano in allevamenti intensivi ove la malattia compare fin dalle prime settimane di vita, onde superare la barriera degli anticorpi materni. È bene tener presente che, per quanto riguarda i vitelli provenienti dalla Francia, la situazione attuale delle condizioni sierologiche dei soggetti tra 8 e 15 giorni di età evidenzia una scarsa presenza di anticorpi IBR (circa 6%) a bassi titoli, mentre più elevati sono quelli da Myxovirus PI 3 (85%), da Adenovirus (87%), da malattia delle mucose (60%); il virus sinciziale respiratorio causa debole positività nel 22% dei capi. Vaccinando tali vitelli con vaccini spenti mediante due interventi a distanza di 14 giorni si ha la seguente evoluzione dei titoli sierici:

I.B.R.: 14 giorni dopo un solo intervento non si riscontra alcun aumento degli anticorpi, mentre 14 giorni dopo il secondo tutti i soggetti presentano una sieroconversione con alti titoli sierici.

PI 3 e Adenovirus: dopo il primo intervento non si nota variazione nei titoli sierici e dopo il secondo si ha un aumento di scarso rilievo, come se la presenza di anticorpi passivi impedisse l'elaborazione degli anticorpi vaccinali.

Questi risultati sono stati analoghi per diversi vaccini spenti sia che venissero utilizzati adiuvanti oleosi, sia idrossido di alluminio con saponina.

Nelle condizioni della pratica l'alta frequenza degli anticorpi PI 3, Adenovirus e BVD spiega la minore incidenza delle malattie relative, in quanto il contatto di animali protetti con il virus ambientale pro-

voca l'instaurarsi, nella maggior parte dei casi, di una immunità naturale attiva specifica.

Viene invece confermata la necessità di vaccinare contro l'IBR, per la quale i vitelli sono per lo più sprovvisti di anticorpi materni.

Per quanto riguarda il Virus Sinciziale, data la gravità della malattia, anche se di scarsa diffusione, e l'impossibilità di utilizzare vaccini inattivati, si potrebbe pensare all'uso di un vaccino attenuato come quello realizzato da Wellemans e coll., attenuando un ceppo mediante 94 passaggi in colture cellulari.

Nei vitelloni (broutards) l'uso dei vaccini inattivati contro il virus IBR mediante due interventi a distanza di 12-15 giorni, rappresenta la metodica di profilassi attualmente più usata, con buoni risultati. Negli allevamenti nei quali l'infezione colpisce precocemente i soggetti introdotti senza possibilità di applicare un periodo di quarantena in un ambiente isolato o nel luogo di provenienza, può essere indicato vaccinare anche con un vaccino vivo.

L'associazione di un vaccino vivo endonasale con uno inattivato potrebbe dare risultati migliori in quanto si ha un'azione inizialmente più rapida data dal vaccino vivo, che può interferire con l'eventuale presenza di virus nell'ambiente, e nel frattempo si instaura una più solida immunità generale stimolata dal vaccino spento.

Per i soggetti che vengono tenuti in allevamento più di 6 mesi, è consigliabile un richiamo dopo 3-4 mesi col vaccino spento.

Un altro aspetto è rappresentato dall'infezione da virus IBR in allevamenti tradizionali, con manifestazioni morbose anche a carico dell'apparato genitale. In tali allevamenti la vaccinazione con virus IBR inattivato ha dato ottimi risultati, con una riduzione dell'infertilità e della mortalità dei vitelli (Kolar).

Fra i mezzi che possono essere utilizzati per stimolare una reazione immunitaria nei bovini ricordiamo gli induttori di paraimmunità o di premunizione che determinano nell'organismo un'attivazione funzionale della resistenza aspecifica, con formazione di interferon ed incremento del sistema cellulare linfoprotettivo.

Oltre ai virus vivi ed attenuati che offrono il vantaggio di una combinazione di effetti specifici ed aspecifici e che agiscono da induttori quando sono associati al vaccino specifico inattivato, si sono avuti buoni risultati con un preparato allestito con un virus del vaio-

lo aviare, eterologo per il mammiferi e non più capace di replicazione (Wizigmann).

Ricordiamo inoltre le esperienze di Ballarini nella prevenzione e nel trattamento di vitelli con infezioni da BVD-MD in forma intestinale e respiratoria mediante la somministrazione di vaccino vivo attenuato (ceppo cinese) per la peste suina classica, seguita da un trattamento immunostimolante con levamisole.

L'attività immunomodulante del levamisole offre delle possibilità applicative anche nei confronti dell'IBR, specie negli animali giovani ove è facile osservare limitate risposte immunitarie (Ballarini). La somministrazione del prodotto deve essere effettuata dopo la vaccinazione, in quanto se fatta prima può ridurre l'efficacia del vaccino.

L'utilizzazione dei corticosteroidi in modo indiscriminato, come avviene sovente negli allevamenti intensivi, può con la sua azione immunosoppressiva causare una deficiente risposta immunitaria e rendere gli animali più recettivi alle infezioni virali, oltre che attivare una eventuale infezione latente con disseminazione del virus (Davies-Kabelik).

In questa rapida disamina dei criteri che si possono adottare per la profilassi vaccinale delle infezioni respiratorie del bovino, ho citato anche prodotti che attualmente non sono disponibili in Italia, in particolare alcuni vaccini vivi attenuati.

D'altra parte occorre tenere presente che se i provvedimenti previsti dalla circolare n. 110/1978 del MINSAN fossero applicati integralmente, non sarebbe necessario ricorrere all'uso di tali vaccini e gli allevatori potrebbero ottenere una notevole riduzione delle perdite con rilevanti vantaggi economici.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

BALLARINI G. (1979) Il Progr. Vet., *34*, 278.
BALLARINI G. (1976) Riv. Zoot. Vet., *6*, 637.
BITTLE J. L. (1970) J. of Dairy Sc., *53*, 625.
BOGEL K. (1972) Progr. Immunob. Stand., *5*, 309.
BOGEL K. (1972) Progr. Immunob. Stand., *5*, 314.
DAVIES D. A., DUNCAR J. R. (1974) The Corn. Vet., *64*, 340.
GOSSET F. O., GALE C., GREGORY R. P., MATSUOKA T. (1970) J.A.V.M.A., *157*, 174.

GUTEKUNST D. E., PATON J. M., VOLENEC F. J. (1969), *155*, 1879.
JOHNSTON R. V., MAC LEAN G. J. (1967) Pract. Vet., *2*, 34.
JUHASZ M., PALATKA Z., TOTH B. (1974) Develop. in Biol. Stand, *26*, 5.
KAHRS R. F. (1976) Mod. Vet. Pract., *57*, 29.
KOLAR J. R., SCHECHMEISTER I. L., STRACH L. E. (1973) Am. J. Vet. Res., *34*, 1469.
IRWIN M. R., HOHMBERG C. A., KNIGHT H. D., HJERPE C. A. (1976) Am. J. Vet. Res., *37*, 223.
LARSON K. A., SCHELL K. R. (1969) J.A.V.M.A., *155*, 495.
MATSUOKA T., FOLKERTS T. M., GOLE C. (1972) J.A.V.M.A., *160*, 333.
MOELLER D. J. (1969) J.A.V.M.A., *154*, 1197.
MONDINI S. (1976) Inform. Zoot., *21*, 8.
PHILLIP I. H. (1970) Vet. Rec., *86*, 280.
PEETERMANS J. (1975) Réunion Scient. D'Information, Bruxelles, RIT.
ROSSI C. (1972) Progr. Immunob. Stand. *5*, 319.
ROSSI C. (1977) Atti Soc. It. Buiatria, *9*.
ROSSI C., BECCARIA E. (1973) Atti Soc. It. Buiatria, *5*, 260.
ROSSI C. (1976) Raggio di Sole, *1*, 2.
SCHIPPER J. A., KELLING C. L. (1971) Can. Vet., *12*, 172.
SHEFKI M. D., EDGSON F. A., RAINGILL G. S. (1968) Vet. Rec., *82*, 764.
STONE D., SIMM P. D. (1975) 8° Congr. Intern. di Buiatria, Milano, 494.
WELLEMANS e coll. (1978) Ann. Med. Vet., *122*, 527 - 537 - 544.
WIZIGMANN G. (1977) da Sel. Vet., *19*, 742.
WOODS G. Z. e coll. (1967) Am. Rev. Resp. Dis. *95*, 278.
WOODS G. Z. e coll. (1968) Am. J. Vet. Res., *29*, 1349.
ZYGRAICH N. e coll. (1974) Res. Vet. Sci., *16*, 328.
ZYGRAICH N. e coll. (1974) Develop. Biol. Standard, *26*, 8.
ZYGRAICH N. e coll. (1974) Zbl. Vet. Med. B., *21*, 138.
ZYGRAICH N. e coll. (1975) Develop. Biol. Standard, *28*, 482.

F. CARLOTTO

PRINCIPI E METODICHE DEL PRE-CONDIZIONAMENTO DEI BOVINI DA CARNE

È noto come l'introduzione di giovani bovini nei centri di ingrasso comporti tutta una serie di problemi di carattere sanitario.

Nel nostro Paese questi problemi sono particolarmente complessi per le modalità molto eterogenee di approvvigionamento dato che questo avviene mediante l'acquisto di vitelli già svezzati e pronti per l'avviamento all'ingrasso o più spesso di vitelloni da ristallo, provenienti prevalentemente dall'estero. Una quota importante ed in aumento in questi ultimi anni è rappresentata dall'acquisto di vitelli da svezzare di provenienza estera e, in misura più limitata, dal mercato nazionale.

Queste sono le categorie di animali che vengono introdotti nei centri di ingrasso, animali che devono sopportare una serie di stress notevoli che vanno dal trasporto, spesso a lunga distanza, in condizioni non sempre appropriate, all'adattamento all'alimentazione e al tipo di stabulazione. Inoltre occorre considerare che spesso questi giovani animali sono provvisti di scarse difese immunitarie nei confronti dei principali agenti patogeni dominanti nei centri di ingrasso.

Direi quindi che i molti problemi che insorgono trovano piena giustificazione.

Negli Stati Uniti sono sempre esistiti i problemi suscitati dai vitelli destinati ai *feedlots* tanto che varie tecniche di precondizionamento sono state preconizzate e sovente adottate su larga scala in diversi territori; queste tecniche inizialmente miravano più che altro a conferire, mediante l'impiego di vari vaccini, un certo grado di immunità ai vitelli prima del loro inoltro ai *feedlots* per contenere soprattutto i danni dovuti alle malattie respiratorie.

Nel tempo il concetto di pre-condizionamento è andato man mano sviluppandosi assumendo un significato più complesso e comprendendo una serie di procedimenti: graduale variazione dell'ali-

mentazione per evitare i bruschi cambiamenti nel *feedlot,* uso di strutture similari a quelle del *feedlot* adottando eguali tecniche di abbeverata e vari altri accorgimenti tendenti sempre a ridurre lo stress del cambiamento. Inoltre sono spesso previste altre operazioni in relazione a particolari necessità quali ad es. la castrazione, la decornuazione, i trattamenti contro i parassiti.

Varie associazioni americane poi lavorano tuttora per stimolare lo sviluppo di programmi standardizzati che prevedono l'identificazione dei vitelli e l'acquisizione di documenti che forniscano all'acquirente notizie precise sul tipo di pre-condizionamento adottato. Esistono pure varie forme di contribuzione per gli allevatori di vitelli al fine di incentivare il pre-condizionamento.

Per noi, come dicevamo, il problema diventa assai più complesso visto il contingente di animali di provenienza estera il che richiederebbe il pre-condizionamento nei paesi di origine. Questo non è facilmente realizzabile soprattutto per motivi economici, il pre-condizionamento infatti ha dei costi che l'acquirente può anche in parte sopportare in cambio delle maggiori garanzie solo se l'onere che ne risulta è contenuto; d'altra parte il produttore di vitelli se non è incentivato non si sobbarca tanto facilmente a nuovi oneri e a procedure che complicano la sua gestione.

Dell'efficacia del pre-condizionamento all'origine abbiamo potuto fare delle osservazioni personali allorché, qualche anno fa, a seguito di accordi con alcune organizzazioni francesi, si organizzò, in via sperimentale, la preparazione in Francia di alcuni contingenti dei cosiddetti «broutards» che, provenendo da pascoli, presentavano i più grossi problemi di adattamento; i risultati furono fin dall'inizio soddisfacenti e ciò portò ad affettuare successivamente le operazioni su alcune migliaia di capi nei quali i vantaggi furono molto chiaramente evidenziabili nei confronti dei gruppi di soggetti non sottoposti alla tecnica di pre-condizionamento. In sintesi questi risultati si concentrarono in un più rapido adattamento degli animali dopo l'arrvo nei nostri centri di ingrasso, sia alle particolari strutture che all'alimentazione, in una maggiore resistenza alle malattie, quelle respiratorie in particolare, ed in uno stato di benessere generale comprovato dal rapido raggiungimento dell'optimum di incremento ponderale.

Vediamo ora alcuni dettagli sulle tecniche di pre-condizionamento.

Svezzamento dei vitelli

I vitelli devono essere introdotti in apposite installazioni per lo svezzamento nelle quali si impone la pratica del «tutto pieno, tutto vuoto» con adeguate pulizie e disinfezioni tra un ciclo e l'altro; questa pratica in verità va estendendosi ormai in molti allevamenti.

Il centro di svezzamento dovrebbe però essere sempre al di fuori del centro di ingrasso ad evitare pericolose promiscuità. Inoltre i gruppi di vitelli non dovrebbero essere troppo numerosi, i gruppi di 150-200 capi danno i migliori risultati.

Deve essere posta molta cura al microclima ambientale; lo svezzamento deve essere ben graduato senza forzare l'incremento ponderale e gli animali vanno inseriti nel ciclo di ingrasso dopo una ventina di giorni dalla fine dello svezzamento allorché sono già ben adattati anche al tipo di alimentazione.

Durante il periodo di svezzamento si impongono alcuni interventi profilattici quali l'impiego di vaccini contro le malattie respiratorie, in primo piano la Rinotracheite infettiva, onde conferire ai giovani animali una adeguata base immunitaria almeno contro gli agenti eziologici più frequenti e pericolosi.

Eventuali manifestazioni morbose durante lo svezzamento devono essere controllate con tempestività ad evitare l'instaurarsi di lesioni ai vari apparati che poi potrebbero compromettere il regolare sviluppo degli animali.

Pre-condizionamento dei vitelloni

Non è il caso di ritornare sui dettagli del pre-condizionamento al paese d'origine richiamati in più occasioni e dalle stesse disposizioni ministeriali.

È opportuno invece ricordare che i vitelloni sottoposti ad un periodo di pre-condizionamento all'origine non possono per questo essere controllati con minore attenzione. Si tratta pur sempre di animali che hanno subito lo stress del trasporto e che devono adattarsi ancora con una certa gradualità al nuovo allevamento e soprattutto all'alimentazione. Necessaria quindi una attenta vigilanza sanitaria, curare l'acclimatamento, costituire dei lotti omogenei, inserirli in ricoveri ben ripuliti e disinfettati, graduare il regime alimentare e

valutare, quando è il caso, l'opportunità di interventi vaccinali di richiamo.

Allorché vengono introdotti nel centro di ingrasso animali non sottoposti a pre-condizionamento, possiamo consigliare alcune misure che nella pratica si sono dimostrate efficaci quando adottate in allevamenti sufficientemente organizzati sotto l'aspetto installazioni e personale.

I gruppi di animali da introdurre nel centro di ingrasso devono rimanere isolati per una trentina di giorni in installazioni ben separate dal resto dell'allevamento, molto ben ventilate e tali da permettere un facile controllo degli animali.

Sono state realizzate da alcuni allevatori installazioni estremamente semplici e pratiche.

Le operazioni da svolgersi durante questo periodo sono sostanzialmente le seguenti:

1) formazione di gruppi di animali il più possibile omogenei onde evitare successivi rimescolamenti e le conseguenti turbe che ne derivano;

2) piano alimentare che preveda un passaggio molto graduale da una razione composta inizialmente da solo fieno, all'impiego di mangime concentrato e silomais. Nei primissimi giorni occorre curare molto anche l'avvio degli animali all'abbeverata;

3) preparazione sanitaria vera e propria: vaccinazione già all'arrivo contro la Rinotracheite Infettiva (IBR) ed eventualmente contro i virus riconosciuti più importanti nel determinismo delle manifestazioni patologiche caratteristiche dell'età degli animali e del tipo di allevamento (PI_3, BVD, ecc.), dopo 15-20 giorni vaccinazione di richiamo;

4) per gli animali provenienti dal pascolo, è indispensabile un trattamento contro gli endoparassiti (molto indicato il tetramisole) da effettuare preferibilmente dopo 2-3 giorni dal primo intervento vaccinale. Si dovrà sorvegliare attentamente l'eventuale comparsa di segni di parassitosi cutanee, soprattutto le rogne; nei centri bene organizzati si procede anche alla tosatura sistematica del dorso;

5) spesso dopo alcuni giorni dall'arrivo gli animali manifestano qualche turba respiratoria; in tal caso è opportuno il trattamento

di massa con l'impiego di antibiotici e sulfamidici e supplemento vitaminico riservando trattamenti individuali ai soggetti eventualmente più colpiti.

* * *

Queste sono in via di massima le tecniche consigliabili per la preparazione dei giovani bovini destinati ai centri di ingrasso. Bisogna sottolineare che gli animali per esprimere meglio le loro chances produttive, devono giungere alla fase cruciale dell'ingrasso in buon equilibrio sanitario anche per evitare al massimo manipolazioni dispendiose e in ogni caso non prive di effetti negativi.

Per questo disponendo di animali già ben, per così dire, rodati al sistema, dotati di una base immunitaria valida almeno contro gli agenti patogeni più pericolosi e più diffusi, le *chances* di successo aumentano notevolmente, anche sotto l'aspetto fondamentale del contenimento dei costi di produzione.

L. BELLANI

INFEZIONE RESPIRATORIA DEI BOVINI. NORME DI POLIZIA VETERINARIA

Nella patologia infettiva dei bovini, si va gradualmente riducendo, come è noto, l'importanza delle malattie che un tempo determinavano le perdite economiche più gravi. Infatti, mentre le grandi epizoozie aftose sono ormai diventate un ricordo del passato, grazie agli attuali metodi profilattici, incentrati sulla vaccinazione annuale obbligatoria, l'incidenza della tubercolosi e della brucellosi bovina è scesa a valori assai modesti, a seguito della realizzazione di apposite campagne di eradicazione.

Nel contempo, nuove situazioni preoccupanti sono gradualmente emerse nel panorama delle forme morbose a carattere infettivo del settore bovino.

Accanto alla comparsa di nuove infezioni, si registra una maggior frequenza di forme un tempo rare e ciò in relazione all'intervento di nuovi fattori epidemiologici, quali l'intensità e la rapidità degli spostamenti degli animali, anche sulle lunghe distanze, alla crescente importanza del polimicrobismo ambientale e dei cosidetti germi «opportunisti», specialmente per i bovini in allevamento intensivo, e al grande incremento delle virosi più disparate.

Per quanto si riferisce agli agenti «opportunisti», è noto che non determinano, in genere, infezioni monocausali, ma infezioni multifattoriali, alla cui patogenesi concorrono cioè svariate cause e soprattutto «fattori favorenti» che rendono possibile a microrganismi normalmente non patogeni di determinare forme morbose clinicamente evidenti.

In questo quadro si colloca la cosiddetta «influenza dei bovini» che può assumere non raramente il carattere di infezione mista, nel senso che sulla infezione di base, sostenuta da virus di modesta patogenicità, come Reovirus, Adenovirus, Parainfluenza 3 ecc., possono

innestarsi, con effetti sinergici, gli interventi di vari elementi figurati, come batteri, micoplasmi, clamidie ecc.

Da un punto di vista generale, al fine di prevenire l'insorgenza delle infezioni da germi oportunisti è importante intervenire contro il polimicrobismo ambientale, evitare il superaffollamento dei ricoveri, mantenere gli animali in condizioni di massimo equilibrio fisiologico e di difese organiche efficienti, escludendo, per quanto possibile, l'intervento di agenti stressanti esogeni ed endogeni, nonché ogni causa di serie disfunzioni metaboliche.

Come si è accennato in precedenza, secondo le attuali conoscenze l'influenza bovina è sostenuta in via primaria da vari agenti virali, ma si conclama clinicamente, di norma, solo quando si realizza il concorso di fattori non microbici endogeni (raffreddamento, strapazzi da trasporto, infezioni persistenti, immunosoppressione, assenza di immunità) e/o esogeni (microclima dei ricoveri insoddisfacente, mutamenti di alimentazione e di alloggiamento effettuati in modo improprio, errori nutrizionali veri e propri, condizioni sfavorevoli di allevamento).

Non vi è dubbio, tuttavia, che le malattie respiratorie comunemente designate con il termine di «influenza», pur essendo «condizionate» dai predetti fattori, rivelano chiaramente un carattere infettivo e diffusivo: insorgono infatti generalmente a seguito della introduzione negli allevamenti di animali di recente acquisto e si propagano in breve tempo fino a interessare a volte l'intero effettivo.

Anche se la gravità delle forme cliniche osservabili nei singoli animali può variare entro limiti piuttosto ampi e pur considerando che altri apparati, oltre a quello respiratorio, possono essere coinvolti, si può affermare che le infezioni in argomento manifestano una stretta affinità sul piano clinico, così come su quello epidemiologico, per cui appare giustificato assimilarle, ai fini della applicazione delle misure previste dal vigente regolamento di polizia veterinaria, alla influenza dei bovini.

La necessità di estendere l'obbligo della denuncia e dei conseguenti provvedimenti sanitari a queste infezioni, senza arricchire l'elenco previsto dall'art. 1 del D.P.R. 8 febbraio 1954, n. 320, appare evidente ove si consideri che, mentre la definizione eziologica delle infezioni stesse pone sovente non lievi difficoltà e riesce impossibile in tempi brevi, l'applicazione tempestiva di appropriate misure di

profilassi e polizia veterinaria in forma obbligatoria è indispensabile per fronteggiare validamente la diffusione del contagio.

La inopportunità di aggiungere nuove malattie all'elenco previsto dall'art. 1 del citato D.P.R. n. 320 si evince inoltre dalla considerazione che la «influenza dei bovini», inclusa in detto elenco sin dal 1954, è da identificarsi, di fatto, con le infezioni respiratorie che hanno acquisito sempre maggiore importanza negli ultimi tempi, in relazione all'incremento verificatosi nell'allevamento industriale dei giovani bovini, finalizzato alla produzione di carne.

Infatti, il quadro clinico di questa entità morbosa è rimasto sostanzialmente immutato nel tempo, mentre le conoscenze relative all'eziologia, lacunose ed incerte nel 1954, sono divenute oggi assai più complete: si parlava allora di un ultravirus affine o addirittura identico a quello della bronchite infettiva degli equini e associato, sovente, a germi di sortita; oggi è nota tutta una serie di agenti virali, che possono agire da soli o variamente associati tra loro, ed una serie di agenti microbici (batteri, micoplasmi, clamidie, miceti) che possono determinare complicanze più o meno gravi.

Per quanto premesso e sulla base di un apposito parere espresso dal Consiglio Superiore di Sanità, con circolare n. 79 del 20 dicembre 1977, il Ministero della Sanità ha diramato istruzioni intese ad ottenere che le sindromi respiratorie dei bovini a carattere infettivo e diffusivo, ove non siano ascrivibili alla pasteurellosi per la quale esistono apposite norme, vengano assimilate alla influenza dei bovini ai fini della applicazione delle misure previste per tale malattia dal vigente regolamento di polizia veterinaria.

Con la stessa circolare sono state fornite indicazioni in ordine ai trattamenti immunizzanti, secondo le quali i virus vaccini vivi modificati devono essere utilizzati soltanto nelle zone in cui apposite inchieste sierologiche abbiano evidenziato un'alta incidenza dei corrispondenti agenti virali, mentre i vaccini inattivati possono essere utilizzati senza tali restrizioni. In tal modo sono state integralmente recepite nella circolare n. 79 le risoluzioni adottate dal Comitato dell'OIE, in occasione della sessione generale svoltasi nel maggio 1977, in materia di vaccinazione contro le malattie respiratorie d'origine virale dei bovini.

Giova ricordare che anche la normativa in vigore nella Germania Federale è in accordo con dette risoluzioni e che in Francia è con-

sentito, al presente, solo l'impiego di vaccini inattivati.

Per quanto riguarda l'obbligo della denuncia, la regolamentazione degli altri Paesi della CEE è invece diversa da quella italiana.

In detti Paesi, infatti, le infezioni respiratorie dei bovini non sono soggette all'obbligo della denuncia, fatta eccezione per la rinotracheite infettiva da virus IBR, che è denunciabile nella sola Irlanda del Nord.

Occorre riconoscere, tuttavia, che il problema del controllo delle virosi respiratorie si pone, in ambito nazionale, in termini assai diversi da quelli esistenti negli altri Pase della CEE.

È noto che gli altri Stati membri dispongono, nel settore zootecnico, di strutture produttive diverse da quelle italiane e che, essendo esportatori di bestiame bovino, sono in grado di garantire un sufficiente livello sanitario ai propri allevamenti senza ricorrere a misure di polizia veterinaria molto severe e con minimo impegno operativo e finanziario.

In Italia, invece, la produzione di carne bovina è non solo insufficiente in rapporto al fabbisogno interno, ma in larga misura dipendente dall'approvvigionamento di vitelli da ristallo provenienti dall'estero. In relazione a questa sempre più massiccia importazione si determina fatalmente il concorso dei fattori che condizionano la insorgenza delle malattie respiratorie: inevitabile presenza di infezioni virali inapparenti in una parte almeno dei vitelli che, dalle aziende più diverse e lontane, sono prelevati per la spedizione in Italia; facili occasioni di contagio nei luoghi di concentramento e sui mezzi di trasporto; esposizione a rischi di subire fame, sete e strapazzi tanto più elevati quanto più lunghi sono i viaggi da effettuare; difficoltà di adattamento al clima delle località di destinazione e al nuovo regime alimentare, ecc.

Ecco perché il nostro Paese è costretto a pagare, più di ogni altro Stato membro della CEE, un alto tributo di perdite economiche alla cosidetta influenza dei bovini e a far ricorso anche a misure di polizia veterinaria per arginare, almeno in parte, la diffusione di queste forme morbose.

D'altra parte la denuncia e l'applicazione dei provvedimenti consecutivi rispondono anche allo scopo di consentire una più completa conoscenza sia della incidenza che delle perdite economiche causate dall'influenza. A quest'ultimo scopo la circolare n. 79 dispone che i

danni causati da ciascun focolaio infettivo siano valutati con la maggiore precisione possibile e formino oggetto di una apposita annotazione nel mod. 1 - Sez. B (notifica di estinzione del focolaio di malattie infettive e diffusive degli animali).

È del tutto evidente che solo dati statistici acquisiti attraverso una rilevazione ufficiale possono costituire un valido supporto per la azione intrapresa da parte italiana presso la CEE per sottolineare:

1) il progressivo incremento degli episodi morbosi a carattere infettivo causati dalla importazione in Italia di animali provenienti dall'area comunitaria;

2) la palese inefficacia della vigente normativa sanitaria concernente gli scambi intracomunitari di animali nella prevenzione di detti episodi e, segnatamente, delle malattie respiratorie dei bovini;

3) la necessità di organizzare efficaci azioni a carattere preventivo e di modificare, in parte, la regolamentazione comunitaria.

DISCUSSIONE

Alla esposizione delle Relazioni, raggruppate, per argomento, ha fatto seguito un'ampia discussione. Poiché gli intervenuti hanno spesso rivolto domande a più di un Relatore, si è ritenuto opportuno di accorpare i vari interventi in una voce unica e di riportarli nell'ordine che segue. Ad essi fanno seguito le risposte dei Relatori.

Prof. G. Ballarini

In relazione a quanto riferito dal Prof. Rossi, confermo l'efficacia dei vaccini spenti soprattutto se somministrati in dosi ripetute. È tuttavia da rilevare l'opportunità di essere cauti nell'uso di vaccini poco noti (leggi: di importazione non autorizzata) e soprattutto dei rischi dei vaccini con adiuvanti oleosi. I cortisonici non sono di per sé indicati nelle infezioni virali ma non è detto che non si possano usare farmaci (antistaminici) attivi sugli organi della respirazione.

In relazione a quanto riferito dai Proff. Maglione e Castrucci vorrei dire che, come dimostrano le ricerche eseguite nel cimurro del cane, non esistono precisi parametri di correlazione fra malattia (gravità ecc.) e titolo anticorpale, come pure con la risposta al trattamento vaccinale per via endovenosa con vaccino vivo. È probabile che molte virosi localizzate all'ambito respiratorio siano da considerare «croniche» e cioè di durata di diverse settimane (4-6 ed oltre). In questo caso vi sono elementi che indicano come l'uso di immunostimolanti fornisce indubbi vantaggi.

Prof. L. Bellani

Ringrazio il Prof. Ballarini per il contributo di enorme valore pratico, specialmente per coloro che debbono dettare norme di Polizia

Veterinaria o adeguare quelle esistenti alla stregua delle nuove acquisizioni. Già da ora mi dichiaro d'accordo sulla denunciabilità limitata delle malattie di cui ai gruppi B, C e D.

Esprimo tuttavia perplessità sulla non denunciabilità delle forme morbose di cui al gruppo A, tipo *shipping fever,* perché spesso vi sono forme virali cui le misure di Polizia Veterinaria debbono, perché possono, essere applicate.

Sicuramente è da respingere la tesi in base alla quale i «cronici» dei gruppi B, C e D debbono essere lasciati sopravvivere al di là del ciclo produttivo dei conviventi spediti già sani al macello, per farli convivere con i «nuovi» animali del ciclo produttivo successivo. Data la bassa incidenza dei «cronici», come affermato dal Prof. Ballarini, pare più opportuno ipotizzare l'abbattimento con utilizzo, a giudizio dell'ispettore delle carni, e con indennizzo totale o relativo dell'allevatore.

Nell'ambito delle forme descritte dal Prof. Ballarini per il gruppo E, esprimo l'avviso che non si debba provvedere alla denuncia della malattia ai sensi dell'art. 1 del Regolamento di Polizia Veterinaria n. 320.

Sottolineo l'importanza, accanto agli altri fattori di allevamento, anche di quella che si può definire «monocoltura animale» nella quale mancano contatti tra specie diverse e dove rapidi e molteplici passaggi tendono a virulentare le entità infettanti.

Dott. F. Cancellotti

Al Prof. Flammini chiedo quale interpretazione dà alle sieroconversioni contemporanee verso i tre sierotipi di Reovirus bovini. Secondo l'esperienza personale con la tecnica della siero-neutralizzazione, la risposta anticorpale è specifica di tipo.

Al Prof. Castrucci chiedo se per il virus BVD si può parlare ancora di ceppi «citopatogeni» e «non-citopatogeni» e se tale schematizzazione debba essere limitata ad un determinato tipo di substrato quale ad esempio il rene fetale bovino. Secondo l'esperienza personale, usando cellule derivate da milza fetale bovina, la quasi totalità dei ceppi di BVD esaminati ha mostrato un effetto citopatogeno su tale substrato.

Dott. S. Caracappa

Vorrei porre due domande al Prof. Rossi. La prima riguarda la opportunità di sottoporre a trattamento, con i preparati disponibili in Italia, animali con malattia in fase acuta. In questo caso si ripeterebbe l'esperienza nota da anni in medicina canina e riguardante la vaccinazione per via venosa di animali con malattia conclamata.

Secondariamente vorrei qualche informazione sugli stipiti virali adattati a coltivare a 30-32°C ed utilizzati come vaccini da somministrare per via nasale allo scopo di conferire una immunità locale delle prime vie aeree.

Al prof. Flammini chiedo se abbia esperienza sulla evidenziazione di Clamidie mediante immuno-fluorescenza.

Al Dott. Sidoli chiedo se è stato effettuato l'esame microscopico a fresco sul polmone degli animali esaminati. Quali sono stati gli antibiotici impiegati per il risanamento delle sospensioni allestite dal polmone ed inoculate in embrione di pollo. Se, oltre a quest'ultimo, si è fatto ricorso anche all'inoculazione di animali da esperimento.

Prof. G. Castrucci

I Colleghi Proff. Scatozza e Baglioni hanno, in maniera molto chiara, ricordato i molteplici aspetti di ordine ezio-patogenetico che contraddistinguono le sindromi respiratorie del bovino.

L'eziologia di dette sindromi costituisce in realtà un problema difficilmente inquadrabile secondo gli schemi classici che caratterizzano questo particolare capitolo delle malattie infettive in generale. Nel caso specifico, infatti, è dato di constatare come i singoli episodi di malattia siano indotti dall'intervento più o meno contemporaneo di microorganismi di varia natura per i quali, d'altra parte, riesce estremamente difficile stabilire l'esatta responsabilità nel meccanismo patogenetico che è all'origine della condizione morbosa clinicamente manifesta.

Sempre in campo di eziologia, mentre appare corretto, almeno allo stato attuale delle conoscenze, affermare che virus appartenenti a Famiglie diverse possono espletare attività patogena a carico delle vie respiratorie del bovino, allo stesso tempo però sarebbe impresa

difficile quella di stilare un elenco preciso di agenti virali ritenuti responsabili di sindromi respiratorie senza incorrere nel rischio di commettere errori per difetto o per eccesso. Tale rischio sussisterà fino a quando le nostre conoscenze sulla biologia dei virus non potranno essere ulteriormente migliorate.

A proposito di patogenesi, certamente i fattori predisponenti esplicano un ruolo di primaria importanza nell'insorgenza delle malattie respiratorie. Anche sotto questo aspetto, data la diversità di detti fattori, sarebbe estremamente difficile tracciare un comportamento «standard» dell'infezione.

Il quadro risulta estremamente complicato se si considera con quanta frequenza gli episodi morbosi insorgano in seguito alla recrudescenza di un'infezione latente. Infatti, in questi casi che possiamo definire di infezioni ricorrenti, il meccanismo patogenetico che regola l'insorgenza di una malattia clinicamente manifesta è certamente diverso rispetto a quello riscontrato nelle forme d'infezione primaria. D'altra parte non appare neanche possibile inquadrare in maniera precisa le forme ricorrenti la cui patogenesi è strettamente dipendente dallo stato immunitario del singolo soggetto.

Dott. F. Ferrari

Al Prof. Bellani vorrei chiedere delucidazioni in ordine alla necessità di denunciare la comparsa di «sindromi respiratorie» vista l'attuale situazione esistente negli allevamenti. Esiste inoltre una notevole difficoltà nella diagnosi differenziale delle malattie respiratorie e nella definizione del loro decorso sul piano epidemiologico e clinico. In tale situazione ci si può domandare su quale base debba essere effettuata la denuncia e, soprattutto, quando un allevamento possa essere considerato sano.

Prof. L. Nardelli

Il mio intervento riguarda in primo luogo l'influenza dell'ambiente sulla malattia respiratoria. Un esempio assai caratteristico a questo riguardo è fornito dalle modificazioni di comportamento del

virus della IBR/IPV. Questo virus causava inizialmente un quadro clinico a sede genitale noto nella letteratura veterinaria tedesca che risale a 150 anni fa. A causa della sua natura venerea, la malattia era nota come «esantema vescicolare coitale».

Attualmente ci si può meravigliare che il virus fosse allora incapace o quasi di produrre una infezione respiratoria o che esisteva allora la mancanza di opportunità di sviluppare proprietà patogene per l'apparato respiratorio.

Ciò può trovare spiegazione, secondo D. G. McKercher, sulla base del tipo di allevamenti di bovini allora dominante. Gli allevamenti a quei tempi erano solitamente costituiti da una o due vacche sufficienti per coprire il fabbisogno di una famiglia. Per ottenere il massimo dell'utilizzazione dei pascoli limitati, annessi alle aziende, i bovini venivano legati anche quando erano al pascolo. Quindi essi erano praticamente ed efficacemente isolati uno dall'altro e la possibilità che si avverasse una infezione aerogena era minima. Il toro comunale o circondariale era l'unica possibilità di contatto fra le varie vacche e in tal modo l'infezione si diffondeva solo per via genitale. Quando si presentava l'infezione aerogena, il che senza dubbio è avvenuto di quando in quando, l'immunità che risultava dall'infezione genitale proteggeva contro l'infezione dell'apparato respiratorio.

Negli anni '20 sono stati esportati bovini dall'Europa agli Stati Uniti e non sorprende quindi che il virus sia stato esportato in quel Paese. Né sorprende che inizialmente esso abbia causato una infezione genitale, poiché allora anche negli Stati Uniti dominava essenzialmente lo stesso tipo di allevamento e in particolare allevamenti chiusi in cui era usata la monta naturale come in Europa centrale. Una volta arrivato negli Stati Uniti era inevitabile che il virus venisse anche trasferito anche ai *feedlots* negli Stati del centro e dell'ovest degli USA. Si crede che questo sia avvenuto verso la fine degli anni '40. La diffusione del virus nei primi tempi può essere sfuggita poiché i bovini all'ingrasso sono inattivi dal punto di vista riproduttivo. Però, anche se poco sensibili all'infezione per via genitale, questi animali erano invece altamente sensibili ad un'infezione delle vie respiratorie. Infatti erano presenti un gran numero di condizioni che facilitavano la diffusione delle infezioni respiratorie favorendo lo sviluppo di mutanti virali con predilezione per l'apparato respirato-

rio. È nata così una nuova sindrome clinica, frequentemente accompagnata da congiuntivite e caratterizzata da gravi conseguenze, nota appunto come IBR.

Attualmente i bovini sono soggetti a condizioni ambientali assai dure create da certi tipi di allevamento. Questa situazione si ha particolarmente nei *feedlots* più che in altri tipi di allevamento. Si stima che negli Stati Uniti muoiono circa mezzo milione di animali ogni anno soprattutto da infezioni respiratorie e, in particolare, da *shipping fever,* durante e dopo i trasporti dai posti di produzione dei vitelli ai *feedlots.*

Praticamente tutti i vitelli da carne degli Stati Uniti sono prodotti nelle cosiddette unità «vacche-vitello». I vitelli rimangono con le loro madri per i primi 6-8 mesi di vita. Vengono quindi svezzati e posti al pascolo per 5-7 mesi. Dopo il pascolo sono spediti direttamente per il finissaggio ai grandi *feedlots.* Però, probabilmente, la maggior parte raggiunge questa destinazione dopo periodi variabili su mercati, luoghi di concentramento ecc. e molti di questi punti sono dei veri e propri gravi focolai d'infezione.

La maggior parte dello stress a cui gli animali da carne sono esposti deriva dai lunghi trasporti in camions aperti o vagoni ferroviari aperti, spesso in condizioni climatiche non favorevoli.

Nella maggior parte dei casi i bovini raggiungono i *feedlots* disidratati, strapazzati ed in stato di grave agitazione. I bovini che vengono dai mercati o simili sono spesso già ammalati all'arrivo, oppure negli stadi preclinici dell'infezione. Quelli che arrivano direttamente dai pascoli possono richiedere parecchi giorni o più per ambientarsi agli abbeveratoi automatici, ai vari sistemi di alimentazione ed all'alimentazione differente. Nello spazio di 7-10 giorni i nuovi arrivati vengono solitamente anche vaccinati, castrati, decornicati se necessario, marcati, trattati per i vermi e l'ipoderma, inoculati con vitamine e siero.

Tutte queste manipolazioni vengono fatte con poca «dolcezza» e provocano quindi ulteriori stress sugli animali già gravemente traumatizzati fisicamente ed emotivamente.

Quando sono nei *feedlots,* gli animali vengono sottoposti ad altri stress e cioè fattori climatici sotto forma di calore e polvere, sbalzi di temperatura, vento, fango, pioggia, neve.

I bovini da latte sono ordinariamente sottoposti a stress molto

inferiori delle razze da carne. Però quando essi sono posti in condizioni paragonabili agli animali da carne, la malattia respiratoria diventa frequente anche nei bovini da latte.

* * *

Una seconda considerazione si riferisce alle norme da seguire nel prelievo dei campioni di materiale patologico. È importante poter determinare i virus che sono in causa nell'infezione iniziale perché, in tal modo, si potrebbe intervenire con adeguati vaccini. La determinazione della natura del virus «iniziale» in pratica è però piuttosto difficile. Spesso la fase acuta è già passata quando il veterinario o il laboratorio vengono chiamati in causa.

Per ovviare a questo inconveniente è bene che i prelievi vengano fatti non soltanto dagli animali ammalati clinicamente ma anche da altri animali presenti nell'azienda (preferibilmente quelli febbricitanti) apparentemente ancora sani al fine di poter individuare ed isolare il virus nello stadio d'incubazione.

Un altro punto importante è rappresentato dalle modalità della raccolta di campioni dagli animali vivi.

Il metodo tradizionale di raccogliere campioni di cellule muconasali per l'isolamento dei batteri o virus è quello costituito da cotone non assorbente attaccato ad un bastoncino di legno. Tali tamponi frequentemente però si dimostrano insufficienti in quanto contengono uno scarso numero di cellule e di secreto e rapidamente vengono rovinati nel trasporto.

Lo sviluppo delle tecniche degli anticorpi fluorescenti o coniugati con enzimi ha messo a disposizione tecniche attendibili per la diagnosi di numerose malattie da virus nei primi stadi della malattia o dell'infezione. A questo fine sono richiesti però buoni preparati di cellule epiteliali nasali da esaminare su vetrini porta-oggetto. Il metodo convenzionale del tampone con il cotone solitamente non fornisce buoni risultati.

Inoltre è da ricordare (Hanson, 1976, Am. J. Vet. Res., *37*, 706) che la scelta del materiale per il prelievo del muco o scolo nasale è di notevole importanza. Per esempio, i tamponi all'alginato di calcio che danno risultati così favorevoli in batteriologia, non vanno bene per l'isolamento dei virus. In particolare è stato trovato che il virus IBR viene distrutto in meno di 6 ore quando è a contatto con

lana di alginato di calcio in un terreno MEM. I tamponi di cotone con poliesteri in MEM hanno azione virulicida modesta. Però è stato osservato che i titoli in cotone con poliesteri vengono abbassati in confronto ai controlli. Il trattamento con ultrasuoni, l'agitazione in una soluzione di siero bovino fetale, scongelamento e congelamento non si dimostrano buoni metodi di eluizione poiché con ogni metodo è stata osservata o una diminuzione di titolo oppure, talvolta, anche un aumento di titolo seppure modesto dovuto probabilmente a rottura degli aggregati virali. I metodi di congelamento e scongelamento provocano una sensibile riduzione del titolo virale che non raramente raggiunge il 90%.

Sembra invece che dia risultati favorevoli il metodo proposto da Baskerville e Lloyd (Vet. Rec., 1977, p. 78). Una pompa a vuoto aspira le cellule epiteliali ed i secreti del naso, del faringe, dei genitali o di altri distretti dell'organismo. Il secreto nasale viene raccolto in particolari vasetti nello spazio di un minuto. Viene aggiunta soluzione fosfatica tampone al secreto, i tubi di raccolta vengono risciacquati.

Il campione viene quindi centrifugato a bassa velocità per 5 minuti. Si fanno strisci su vetrini porta-oggetto a partire da una porzione del *pellet* delle cellule centrifugate. Lo striscio viene quindi asciugato e fissato in acetone e alcool etilico per 5 minuti. Questo striscio è utilizzabile per la tecnica degli anticorpi fluorescenti o coniugati con enzimi oppure anche per la colorazione con ematossilina-eosina, Giemsa o altri metodi. Gli strisci ottenuti a partire dall'essudato nasale contengono cellule epiteliali ben conservate ed isolate, accanto ad alcune cellule epiteliali desquamate.

È da ricordare che, mentre molti virus, come ad esempio gli Adeno, sono resistenti al trasporto ed alla conservazione, altri virus respiratori, come ad esempio il respiratorio sinciziale, sono labili. A causa di questo carattere si consiglia di non congelare il campione e, secondo alcuni Autori, è preferibile portare le cellule all'animale ed inoculare il muco nasale direttamente sulle relative colture.

Dott. G. Poli

Al Prof. Rossi vorrei far presente che il Prof. Ballarini ha ricordato il cimurro quale esempio classico della mancata correlazione

fra il titolo degli anticorpi circolanti e protezione dalla malattia; anche per l'IBR come per le altre malattie virali è preponderante il ruolo giocato dalla immunità cellulo-mediata rispetto agli anticorpi sierici.

Fatte queste premesse, la mia domanda è la seguente: come mai, per la valutazione dell'efficacia dei vaccini sperimentali, non si impiega la valutazione dell'immunità cellulo-mediata, per lo studio della quale sono state messe a punto metodiche estremamente valide.

Dott. O. Pozza

In ordine a quanto riferito dal Dott. Sidoli ritengo utile che, accanto all'esame colturale per la evidenziazione di germi di irruzione secondaria, vada sempre associato il test di sensibilità agli antibiotici (antibiogramma) al fine di individuare l'antibiotico di prima scelta per trattare questo tipo di affezioni.

Inoltre, chiedo al Prof. Ballarini come devono intendersi le forme croniche. Riacutizzazione di processi infiammatori pregressi o stati patologici determinati da lesioni anatomo-patologiche irreversibili?

Prof. C. Rossi

Mi complimento con il Prof. Ballarini per il riuscito tentativo di dare uno schema chiarificatore sulle malattie respiratorie dei bovini. Rilevo però le difficoltà di concepire tale schema che si scontra con tutta la patologia infettiva degli animali, specie degli allevamenti intensivi. Al riguardo è da tenere a mente l'esempio degli allevamenti bovini tradizionali nei quali l'infezione da IBR/IPV decorre in modo diverso nei giovani e negli adulti.

RISPOSTE

Prof. T. Baglioni

Per spiegare quanto detto dal Prof. Nardelli si potrebbe pensare che la lattoferrina, se ha un'azione difensiva, la eserciti dopo le prime tre settimane di vita. La stimolazione alla sintesi potrebbe richiedere un certo tempo.

Prof. G. Ballarini

Al Prof. Rossi confermo che esistono sensibili differenze negli aspetti clinici delle malattie respiratorie anche in rapporto al tipo di allevamento. Considerando ad esempio l'infezione da IBR è possibile avere dei «modelli» di malattia differenti nell'allevamento del vitello a carne bianca, del vitellone allevato con silomais, della vacca da latte a stabulazione fissa o libera. In questi due ultimi tipi di allevamento esistono nette differenze per quanto riguarda il rapporto fra la forma respiratoria e quella genitale (come diffusione, gravità, tipo di manifestazioni e così via).

Al Dott. Pozza rispondo che la situazione di «cronicità» difficilmente è definitiva; anzi, nella maggior parte dei casi, è una situazione solo di squilibrio nella quale sono frequenti riaccensioni («ricadute») soprattutto in condizioni di stress.

Con il Prof. Bellani concordo nella opportunità di collegare la denunciabilità alla presenza di una situazione clinica, nella necessità di eliminare tempestivamente gli animali cronici in quanto non redditizi dal punto di vista zooeconomico, ma soprattutto perché fortemente rischiosi per essere diffusori di cariche infettanti in occasione di riaccensioni.

Prof. G. Castrucci

In linea di massima ritengo ancora corretta l'affermazione secondo la quale il virus della diarrea virale del bovino (BVD) sarebbe costituito, in larga maggioranza, da stipiti? della proprietà di indurre effetto citopatico.

La suddetta considerazione appare appropriata in quanto il riferimento riguarda in maniera diretta l'applicazione delle colture cellulari a scopo diagnostico. Viceversa, l'affermazione di cui sopra potrebbe essere modificata allorquando un determinato stipite di virus BVD, originariamente ritenuto non citopatico, costituisse oggetto di ricerca. In questo caso, infatti, la possibilità di provare diversi substrati cellulari, l'esecuzione di un certo numero di passaggi seriali sono elementi che potrebbero favorire la selezione di una mutante virale capace di provocare alterazioni cellulari manifeste.

Prof. C. F. Flammini

Al Dott. Cancellotti rispondo che la comparsa di reazioni eterotipiche dopo infezione da Reovirus costituisce un fatto ben noto nella letteratura. D'altra parte, l'esistenza di reazioni crociate fra Reovirus 1 e 3, da noi stessi rilevate alla immuno-fluorescenza diretta, trova conferma nel lavoro di Welch e Twiehaus.

Al Dott. Caracappa rispondo che non abbiamo alcuna esperienza sulle possibili applicazioni dell'immuno-fluerescenza allo studio delle Clamidie.

Prof. E. Maglione

Il Prof. Nardelli chiede il tempo di persistenza degli anticorpi a seguito dell'infezione. In merito al virus RSB si può ritenere che, in seguito ad infezione recente o ad infezione sperimentale, gli anticorpi fissanti il complemento e quelli inibenti l'immuno-fluorescenza indiretta persistono circa tre mesi mentre quelli siero-neutralizzanti sono di più lunga durata.

Prof. C. Rossi

Per quanto imprecisa, la tecnica della ricerca di anticorpi circolanti anti-IBR si dimostra ancora valida per dare indicazioni sulla validità di un vaccino, mentre la metodica dello studio dell'immunità cellulo-mediata, per ammissione degli stessi studiosi che l'hanno applicata allo scopo di evidenziare eventuali portatori sani di IBR, deve essere affinata ulteriormente.

In merito al quesito posto dal Dott. Caracappa posso dire che, disponendo in Italia di vaccini a virus spento, si consiglia di ricorrere al loro impiego a scopo preventivo e su animali clinicamente sani.

Per quanto riguarda l'impiego dei mutanti TS a scopo vaccinale per instillazione endonasale, è noto che esse determinano un più pronto sistema di difesa immunitario, prevalentemente a livello locale, con anticorpi di tipo IgA e produzione di interferone, mentre i vaccini a virus spento agiscono mediante un meccanismo più lento, ma più duraturo, stimolando la produzione di anticorpi sierici di tipo IgG e IgM e, in minore quantità, anche IgA.

Prof. F. Scatozza

Sono stato chiamato in causa dal Prof. Castrucci le cui opinioni sono da me perfettamente condivise. Le indagini delle quali ho riferito confermano ulteriormente che alcuni virus, da ritenere patogeni per l'apparato respiratorio del bovino, circolano largamente anche in assenza di malattia ed in questo non sembrano influenzati dal tipo di allevamento cui gli animali vengono sottoposti. Ciò pone il quesito relativo al significato che essi virus assumono nel campo della patologia spontanea. Se è vero che un'infezione da virus, come dimostrato nel caso dei Myxo, deprime le funzioni della *clearance* polmonare favorendo le sovrapposizioni batteriche e la comparsa delle forme più gravi di malattia, questa dovrebbe comparire sistematicamente essendo frequente l'infezione virale ed inevitabile la sovrapposizione batterica. Ma se è vero, come abbiamo dimostrato, che malattia respiratoria non è sempre associata con infezioni virali, ci si può domandare quale è la vera causa della comparsa delle sindromi respiratorie come le vediamo nella pratica corrente.

Dott. L. Sidoli

Al Dott. Caracappa rispondo che sono stati eseguiti esami microscopici su preparati per impronta da polmone, previa colorazione con Giemsa e Machiavello. L'esito di tali esami è stato negativo. Gli antibiotici impiegati per il risanamento delle sospensioni di polmone erano costituiti da Vancomicina (1 mg/ml) e Streptomicina (5 mg/ml) ed esse sono state inoculate soltanto su embrione di pollo con esclusione quindi di altri animali di laboratorio.

Per quanto riguarda la domanda del Dott. Pozza, relativa al saggio di sensibilità agli antibiotici dei batteri isolati, rispondo che esso viene eseguito sistematicamente col metodo di Kirby-Bauer. I dati relativi non risultano nella relazione in quanto non pertinenti con l'argomento in tema.

CONCLUSIONI DEL COORDINATORE

Allo scopo di evitare imperdonabili omissioni, desidero esprimere subito il mio ringraziamento più sentito ai Relatori per l'impegno con il quale hanno assolto al loro compito e per la collaborazione che mi hanno fornito nel corso di questa giornata e nelle fasi organizzative che l'hanno preceduta. Debbo ancora ringraziare coloro che hanno contribuito a valorizzare l'opera dei Relatori e mia attraverso la partecipazione alla discussione che non esito a definire concreta e costruttiva. Ancora la mia riconoscenza è diretta a tutti i partecipanti per l'interesse nei confronti di questa iniziativa, interesse che si è tangibilmente dimostrato per la paziente attenzione con la quale hanno seguito lo svolgersi dei lavori.

Al Prof. Nardelli, anche in veste di rappresentante degli Enti che ci hanno ospitato, vadano ancora i miei sentimenti di vivo apprezzamento ed in questo ritengo di interpretare il pensiero di ognuno dei presenti.

A mio parere, il lavoro ora concluso ha posto in luce la complessità del problema affrontato e l'esigenza di vedere di quando in quando riuniti esperti di più discipline allo scopo di non renderlo oggetto di artificiosi sezionamenti e di consentire, al contrario, una

visione unicista e certo più vicina alla realtà oggettiva.

Quanto alle diverse questioni oggi emerse, è praticamente impossibile fare una graduatoria in ordine di importanza o di interesse. Fra quelle che mi rimangono maggiormente impresse e senza voler togliere nulla alle altre, mi piace accennare al fatto che, nonostante il cospicuo apporto di contributi sperimentali, l'intimo meccanismo in forza del quale esplode la *malattia respiratoria* fra gli animali e non soltanto fra i bovini non è ancora completamente noto. Di certo sappiamo che esistono numerosi agenti d'infezione da poter chiamare in causa; ancora certo è il fatto che *malattia respiratoria* insorge sotto lo stimolo di condizioni debilitanti ma dove e come entrambi agiscono costituisce ancora oggetto di intuizione e per buona parte è carente di conferma sperimentale.

Nell'ottica predetta si potrebbe arrivare ad ammettere che le infezioni da virus, per le quali tanto ci hanno impegnato i problemi diagnostici e di profilassi specifica, per sé stesse irrilevanti ai fini della patologia spontanea, svolgono una funzione preparatoria alla comparsa di malattia e sono quindi da ritenere come una condizione di stress omologabile, quanto a conseguenze reali o potenziali, agli altri agenti stressanti dei quali si è abbondantemente parlato. Se ciò, almeno concettualmente, viene accettato derivano almeno due conseguenze che riguardano, da un lato, l'importanza eziologica degli agenti virali come concausa di malattia e, dall'altro, l'interesse a prevenirne l'azione attraverso quei metodi di profilassi immunizzante che, fin da tempi ormai remoti, costituiscono il più efficiente presidio per la prevenzione delle infezioni.

È chiaro tuttavia che, onde ottenerne il massimo degli effetti, anche i vaccini vanno studiati, allestiti e valutati con obiettività e rigore scientifico, donde l'esigenza di un loro controllo sperimentale sia in laboratorio che nelle condizioni della pratica insolitamente variabili e diversificate.

Nel campo della diagnostica le posizioni possono divergere nel senso che essa deve avere il prerequisito della rapidità e semplicità di esecuzione. Da ciò consegue, come accennato dal Prof. Ballarini, che l'indagine clinica dovrebbe essere maggiormente utilizzata anche in ordine all'applicazione delle norme di polizia veterinaria e dei provvedimenti di terapia-profilassi da adottare nell'immediato. Essa tuttavia non risolve i quesiti di ordine eziologico ai quali può for-

nire risposta soltanto la diagnosi strumentale in tutte le sue versioni. Su quest'ultima grava anche l'incombenza di indicare la comparsa di agenti «nuovi» come causa di infezione o malattia respiratoria e quindi di arricchire le conoscenze di ordine eziologico ed epidemiologico implicitamente utili in termini di prevenzione. In tale prospettiva dunque la diagnosi strumentale deve possedere anche i requisiti dell'indagine scientifica e, in quanto tale, non dovrebbe essere costretta entro limiti di spazio o di tempo.

Non ritengo di potere ulteriormente abusare della vostra attenzione. Sono certo che questa «Giornata di Studio» ha risposto alle attese di ognuno di noi che erano quelle di un aggiornamento del tema trattato, di un confronto di esperienze e di un arricchimento professionale e culturale.

Finito di stampare il 20 maggio 1980
da La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia