

6. A. D'AMORE. — Recenti acquisizioni sulla pseudo-peste del pollame.

Riassunto. — L'A. espone le nuove acquisizioni sul virus della pseudo-peste aviare con uno sguardo alle prove di emoagglutinazione ed emoagglutinazione inibizione, reazioni divenute di massima importanza per l'identificazione ed isolamento del virus in parola.

Résumé. — Parmi les formes pesteuses de la volaille, une grande importance doit-être attribuée à la pseudo-peste ou maladie de Newcastle; virose qui, pour quelques auteurs, ne serait qu'une forme atténuée de peste, mais qui pour d'autres aurait une parenté avec le virus de la grippe humaine.

Parmi les travaux accomplis par les expérimentateurs du monde entier, l'A. rapporte celui des auteurs américains sur l'analyse chimique du virus et sur les résultats obtenus par l'observation au microscope électronique.

L'A. parle brièvement de l'étiologie, de la pathogénie et des lésions anatomo-pathologiques, ainsi que de la diagnose clinique et des constatations de laboratoire, consacrant un paragraphe spécial aux essais d'hémoagglutination et d'hémoagglutination-inhibition, ces réactions ayant une grande importance pour l'identification du virus pseudo-pesteux.

Enfin, on discute brièvement le problème de la prophylaxie, considérant plus particulièrement la vaccination par des vaccins morts et par des vaccins atténués.

Summary. — The author discusses new findings on the virus of the avian « pseudo plague » or Newcastle disease, particularly with regard to haemagglutination tests and inhibition of haemagglutination, reactions which are of great importance for the identification and isolation of the virus.

Zusammenfassung. — Unter den Geflügelpestarten ist die Pseudo-pest oder Krankheit von Newcastle von grosser Bedeutung; eine Virose, die für manche Verfasser nichts anderes als eine abgeschwächte Pest ist, wäre für andere mit der menschlichen Influenza verwandt.

Von den verschiedenen Arbeiten, die von Forschern der ganzen Welt gemacht wurden, berichtet der V. über jene von amerikanischen Autoren über die chemische Analyse des Virus und über die bei der Beobachtung unter dem Elektronenmikroskop erhaltenen Ergebnisse.

Der V. behandelt kurz die Aetiologie, die Pathogenese und die pathologisch-anatomischen Verletzungen, sowie die klinische Diagnose und die Laboratoriumsfeststellungen und widmet den Hämagglutination - und Inhibition-Hämagglutinationsproben einen eigenen Paragraph. da diese Reaktionen für die Identifikation des Pseudo-Pestvirus von grosser Bedeutung sind.

Zuletzt wird das Problem der Prophylaxis mit besonderer Berücksichtigung der Vakzination mit toten und mit abgeschwächten Vakzinen kurz besprochen.

Fra le forme infettive pestose del pollame quella di Newcastle (DOYLE 1927) (1) desta grande interesse per la sua vasta espansione in America, in Asia, in Europa.

Tale infezione, come è noto, è sostenuta da un virus filtrabile, che secondo alcuni AA. (2) (3) (4) (5), specialmente italiani, non sarebbe altro che quello della peste aviare più o meno attenuato.

BURNET (6) invece, trova una parentela tra questa virosi e l'influenza umana, e tale supposizione è avvalorata secondo l'A. dal fatto che per entrambi i virus si ha il fenomeno di HIRST (7) (8). Però anche il virus della peste aviare reagisce positivamente alla emoagglutinazione e pertanto l'ipotesi del Burnet perde il suo valore specifico.

Il virus della malattia Doyle sarebbe più piccolo di quello pestoso, in realtà però non è possibile basare una distinzione dalle loro dimensioni, variando esse da un minimo di 65 m μ ad un massimo di 10 m μ .

AA. (9) americani hanno concentrato il virus di Newcastle, ottenendo, mediante l'ultracentrifugazione di 100 cc di liquido allantoideo dai 6,4 ai 10,9 mgm di materiale sedimentato. Da tale materiale essi hanno eseguito la microfotografia elettronica che ha mostrato particelle di varia grandezza e forma; talune simili allo spermio, con testa e coda, lunga o breve, tal'altre di struttura ovoidale, senza coda.

L'analisi chimica, sempre del concentrato, ha rilevato la presenza di proteine per circa il 67%, il 27% circa di lipidi e di una relativamente piccola quantità di acido nucleico, del tipo desoximpentoso.

Il virus della malattia di Newcastle oltre ad essere coltivato su embrioni di pollo incubati, sembra potersi sviluppare anche su frammenti di embrioni di pollo e di altri uccelli.

La peste e la pseudo-peste aviare coltivate in embrione di pollo si comportano patogenicamente in maniera diversa a confronto della laringo tracheite. Infatti tali virosi portano a morte l'embrione rispettivamente in 14-18 e 30-48 ore (10) dopo l'inoculazione, mentre gli embrioni inoculati con il virus della laringo tracheite sopravvivono fino al 4-5° giorno (11).

Il virus di Newcastle oltre ad avere una patogenicità minore, per gli embrioni, rispetto alla peste aviare, produce sulla membrana corion-allantoidea lesioni macroscopiche e microscopiche caratterizzate da ispessimento della stessa, e da piccoli focolai opachi, a disposizione dendridica e da emorragie puntiformi a tipo petecchiale.

Istologicamente si osserva una proliferazione ectodermica associata a vacuolizzazione o necrosi degli elementi cellulari e nel protoplasma appaiono inclusioni granulari acidofile. Il foglietto mesodermico reagisce con focolai infiammatori più o meno diffusi.

La resistenza del virus agli agenti chimici e fisici è varia, difatti si mantiene vivo per 21 gg. a 17° c., mentre il disseccamento non permette una lunga conservazione: 9-12 gg. Nella glicerina al 50% il virus contenuto sugli organi resiste tre mesi in ghiacciaia, e una settimana a 37°. Le emulsioni formulate da organi sono avirulente dopo 24h. TYLLEY e ANDERSON (12) hanno determinato il potere disinfettante di alcune sostanze quali: idrato di sodio, ortofenilfenato di sodio, liquor cresolis saponatus, fenolo, formalina, glicol etilene ecc... inoculandole insieme col virus in embrioni di 11 giorni d'incubazione e osservando poi se il virus agiva uccidendo l'embrione o se questo sopravviveva. Gli antisettici più attivi sono il formolo ed il sublimato.

Nelle condizioni naturali il pollo è il più sensibile alla infezione pseudo-pestosa, ma anche le oche, le faraone, i canarini ed i piccioni possono contrarle. A proposito della recettività del piccione all'infezione da Newcastle, è per alcuni AA. considerata così costante da costituire una prova biologica differenziale dalla peste. Contrariamente a ciò il MANNINGER (13) asserisce che l'azione di questo virus è incostante su tale animale. Anche i tacchini, pur non rimanendo infetti, debbono essere presi in considerazione quali portatori, potendo eliminare con le feci grande quantità di virus. PAGNINI (14) ha trasmesso sperimentalmente a lucherini, fringuelli, cardellini, passeri, il virus della pseudo-peste.

Nella letteratura non si parla di azione patogena del virus per l'uomo, tuttavia SCHINKIN (15) ha osservato un caso di emorragia congiuntivale nell'uomo riferibile al virus della malattia di Newcastle, e così pure BURNET (16).

I prodotti di eliminazione che sono molto virulenti assicurano la trasmissione diretta; la contaminazione avviene per os. Risultati dubbi si sono ottenuti con la trasmissione per mezzo di insetti, pulci, mosche. ecc. La trasmissione indiretta si può ottenere per mezzo di gabbie e mangimi infetti e con uova depositate da galline naturalmente infettate (17). La saliva e gli essudati boccali di uccelli colpiti da pseudo-peste sono generalmente più virulenti degli altri escreti ed anche degli stessi tessuti organici. La milza, i polmoni, il midollo spinale, il cervello ed il contenuto intestinale sono regolarmente infettanti. La virulenza del sangue è incostante, mentre nella peste esso ha sempre la massima attività patogena.

I sintomi più frequenti sono a carico dell'intestino (diarrea), del polmone (bronchiti, dispnea) e del sistema nervoso (encefaliti, paralisi).

Il quadro anatomo-patologico presenta le seguenti lesioni: enterite ca-

tarrale e soffusioni sottocutanee allo stomaco ghiandolare (quasi sempre presenti), spesso epatiti, però poco pronunciate.

Sulla faringe, laringe e trachea qualche volta si riscontrano piccoli spandimenti emorragici, accompagnati da una lieve laringo tracheite catarrale. Microscopicamente nei visceri addominali si ha una necrosi cellulare, maggiormente marcata per gli aggregati linfocitari del tratto intestinale. Nel polmone, allorchè l'infezione è a carico delle vie respiratorie, il processo è proliferativo e si traduce in una polmonite interstiziale complicata da fenomeni essudativi, quando si hanno fenomeni nervosi si sviluppa una encefalo-mielite primitiva.

I ceppi europei del virus di Newcastle sono in predominanza enterotropi, mentre quelli americani colpiscono di preferenza i centri nervosi ed il polmone.

La diagnosi della malattia di Newcastle è basata:

1. - Su *dati epidemiologici* quali: la durata della malattia, e quando è possibile determinarlo deve essere tenuto in considerazione il periodo di incubazione.

2. - Su *dati clinici*: rantolo, gozzo pieno (paresi), diarrea, paralisi degli arti.

3. - Su *dati anatomo-patologici*: enterite catarrale e soffusioni sottocutanee allo stomaco ghiandolare.

4. - Sull'isolamento e l'accertamento del virus.

I criteri impiegati in proposito sono:

A) Inoculazione di emulsione di milza, o di saliva o di essudati buccali, in uova gallate. Tenendo presente che gli embrioni di 10-14 giorni di incubazione sono i più favorevoli per la cultura del virus.

Nel caso però che tale virosi sia associata a quella della peste aviare, si ricorra all'impiego di un immunsiero specifico, che permette la neutralizzazione di un virus sull'embrione, lasciando intatta l'attività dell'altro.

B) Azione di un mezzo acido ($\text{pH} = 4.0$) che in un'ora distrugge il virus della peste e non ha alcuna azione apparente su quello della pseudo-peste.

C) Attività emoagglutinante del virus sui globuli rossi di pollo. Si esegua con l'antisiero specifico la prova crociata della inibizione dell'agglutinazione, poichè anche la peste ha un'attività emoagglutinante ed anche il suo siero specifico inibisce lo svolgersi di tale reazione. I sieri di entrambi i virus hanno azione specifica, agiscono solo con i loro antigeni (18).

Data la grande importanza dell'emoagglutinazione e dell'emoagglutina-

zione inibizione, nella diagnosi e nell'identificazione del virus di Newcastle, trovo opportuno descrivere la tecnica di tale reazione.

Per la prova dell'emoagglutinazione è necessario:

1) *Virus*: la sorgente di virus è il liquido allanto-amniotico di embrioni di polli morti, in 24-48h., in seguito all'inoculazione, nella cavità allantoidea, del virus medesimo.

2) *Globuli rossi*: inizialmente Hirst eseguiva la reazione con le emazie degli embrioni di pollo (19) (20), in seguito fu adoperato sangue di giovani polli. Il sangue normale di pollo è prelevato con la puntura cardiaca o con la puntura della vena alare. Il sangue citratato viene accuratamente lavato con soluzione cloruro sodica al 0,85%, dopo l'ultima centrifugazione la soluzione fisiologica viene eliminata e le emazie poste in frigorifero possono conservarsi 5-6 giorni senza subire alterazioni. La sospensione di emazie, preparata ogni giorno, deve essere diluita al 0,5% (21), (AA. americani (22) preferiscono la diluizione all'1%).

E' utile segnalare una precauzione essenziale, la di cui inosservanza può portare ad errori: la soluzione fisiologica da usarsi, sia per il lavaggio dei globuli rossi, come per la diluizione di essi, ed anche per la diluizione del virus nelle provette, deve essere preparata con acqua bidistillata, affinché non vi siano tracce di sostanze estranee che possano danneggiare o rendere aspecifica l'agglutinazione.

Le provette dovrebbero avere un diametro interno di 1 cm., il loro fondo deve essere perfettamente liscio e con una leggera curvatura.

TECNICA PER L'EMOAGGLUTINAZIONE. — In un porta provette si dispone una serie di 11 provette; tutte salvo la prima, ricevono cc. 0,5 di soluzione fisiologica. Nella prima invece si diluisce il virus a 1:10 (cc. 0,9 NaCl + cc. 0,1 virus). Prelevando 0,5 cc. di questa diluizione la si versa nella seconda provetta, contenente già cc. 0,5 di NaCl, avendo una diluizione di 1:20, si preleva cc. 0,5 dalla seconda diluizione e si versa nella terza provetta ottenendo la diluizione di 1:40, si prosegue usando sempre la stessa tecnica fino ad ottenere la diluizione di 1:5.120 (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5.120). Si aggiunge quindi a ciascuna provetta 0,5 cc. di emazie di pollo lavate al 0,5%. Come controllo si pone una provetta contenente 0,5 cc. di soluzione fisiologica più 0,5 cc. di globuli rossi al 0,5%. Tale controllo ha lo scopo di:

1) denunciare il verificarsi di autoemoagglutinazione;

2) servire come punto di riferimento nella lettura dell'emoagglutinazione.



Dopo aver agitato accuratamente le provette le si lasciano a temperatura ambiente (22° C. circa).

La lettura si effettua dopo 1-1 1/2 h., secondo gli americani potrebbe

essere eseguita dopo 25-35 minuti. La lettura della reazione consta nell'osservazione del sedimento e non già nel cambiamento d'intensità del colore del liquido sovrastante ai globuli. Tale lettura può essere facilitata mettendo le provette sotto una luce intensa con uno specchio al di sotto del portaprovette, sul quale appariranno le immagini dei fondi delle provette.

Quando la reazione è negativa le emazie formano un sedimento compatto che riposa nel centro del fondo delle provette, mentre a reazione positiva il sedimento è di aspetto granuloso di colore meno intenso e si distribuisce su tutto il fondo della provetta.

Beach (23) ha dato un valore alle varie forme di agglutinzioni che possono verificarsi:

a) uno strato uniforme granuloso che copre l'intero fondo della provetta (++++).

b) uno strato spesso con contorno irregolare coprente una porzione del fondo della provetta (+++);

c) un piccolo disco centrale circondato da un'arca granulare di cellule agglutinate (++).

d) un largo disco centrale avente una periferia leggermente granulosa (+).

Questa gradazione del valore dell'emoagglutinazione è utile per la prova dell'emoagglutinazione inibizione occorrendo utilizzare per tale reazione il virus alla metà della diluizione che ha dato reazione più netta.

TECNICA PER LA PROVA DI EMOAGGLUTINAZIONE-INIBIZIONE. — Per questa prova oltre al materiale, già sopra menzionato (virus e globuli rossi) occorre un siero iperimmune, che si ottiene da galline iperimmunizzate.

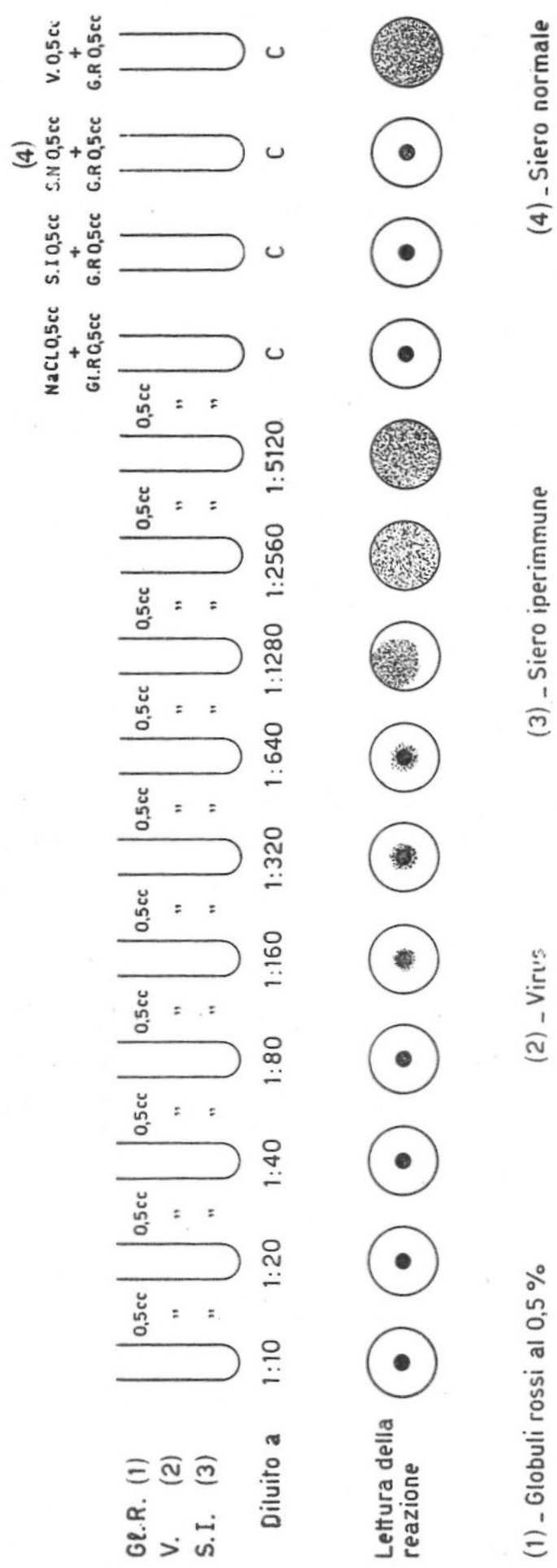
Mentre nella prova precedentemente descritta si diluisce il virus, in questa reazione si diluisce il siero, seguendo la tecnica adottata per la diluizione del virus nella prova precedente.

Ad ognuna delle dieci provette contenenti le diverse diluizioni di siero iperimmune vengono aggiunti cc. 0,5 di una diluizione di virus la quale è la metà della diluizione optimum precedentemente determinata. Ad esempio: alla diluizione di 1:160 il virus ha dato un'agglutinazione nettissima, che secondo Beach equivarrebbe a ++++, nelle provette contenenti il siero diluito, si aggiungerà 0,5 cc. di virus diluito 1:80.

Per ogni provetta si aggiungono inoltre 0,5 cc. di emazie di pollo diluite al 0,5%. Per questa prova i controlli sono quattro e cioè:

1) NaCl + globuli rossi;

FIGURA n. 2



- 2) siero iperimmune + globuli rossi;
- 3) siero normale + globuli rossi;
- 4) virus + globuli rossi.

Si agitano accuratamente le provette e le si lasciano a temperatura ambiente, la lettura viene eseguita dopo 25-35 minuti ed anche più ($1h-1\frac{1}{3}h$). Non è detto che in tutte le provette non vi debba essere agglutinazione anzi essa comparirà più o meno intensamente a seconda della quantità di anticorpi che il siero contiene.

Nei controlli dovremmo avere:

- 1) NaCl + globuli rossi = nessuna emoagglutinazione;
- 2) siero iperimmune + globuli rossi = nessuna emoagglutinazione;
- 3) siero normale + globuli rossi = nessuna emoagglutinazione;
- 4) virus + globuli rossi = emoagglutinazione netta (++++).

Fra le altre prove per l'isolamento e l'accertamento del virus della pseudo-pesto abbiamo:

- D) Neutralizzazione crociata.
- E) Prova d'immunità crociata eseguita su polli vaccinati o guariti.
- F) Attività ossido riduttiva di coloranti da parte del virus della peste, e non da parte della pseudo-pesto.

PROFILASSI. — L'esistenza di differenze immunologiche dei diversi ceppi del virus di Newcastle rende quanto mai difficile il problema della profilassi diretta. Tutti gli sforzi fatti per stabilire un processo attivo immunizzante, che determini un lungo periodo di immunità, sono rimasti senza risultati soddisfacenti. Numerosi sono stati i vaccini preparati, numerosi i metodi adottati nella preparazione, varie le sostanze chimiche sperimentate, ma i risultati ottenuti sono che l'immunità apportata è di breve durata.

In genere in Italia vengono usati vaccini all'embrione di pollo formolati. L'immunità che essi determinano, sebbene il parere degli AA. (23) non sia sempre concorde su tale argomento, non supera mai 60-70 giorni. All'estero e specialmente in America, dove si sta conducendo una lotta organizzata contro tale virosi, si tenta di ottenere il virus di Newcastle attraverso successivi passaggi endocraniali in serie sul criceto (*Hamyster syriam*) (24). La malattia su tali animali si manifesta con irrequietezza, seguita da paralisi e respirazione difficile durante il periodo agonico.

A tutt'oggi però non si conosce ancora a che punto sia l'attenuazione o modificazione del virus e se potrà essere usato come vaccino.

Un nuovo metodo di vaccinazione sta entrando in uso in America (25), in Inghilterra ed in Palestina; il vaccino consiste in virus vivo (ceppo

Denominazione	Peste aviaria	Pseudo - peste	Laringo tracheite
Recettività	Pollo, tacchini, gallina faraona, pavoni, fagiani, e pappagalli	Pollo, piccione, oche, canari.	Pollo, fagiani, più raramente oche, canari, tacchini
Incubazione	1-4 giorni	5 e più giorni	3-12 giorni
Durata malattia	2-5 giorni	5 e più giorni	Raramente 2-4 giorni. In media 15 giorni.
Sintomatologia	Sonnolenza, cianosi, edemi della testa ed al collo, turbe respiratorie, qualche volta turbe nervose	Turbe respiratorie gravi sintomi nervosi, spesso paresi del gozzo e degli arti	Secrezione siero-mucose, qualche volta emorragiche o fibrinose del laringe, trachea, del polmone. Qualche volta congiuntivite
Affinità tissurale	Pantotropo (forme setticemiche)	Organotropo limitato (non si ha setticemia)	Eminentemente il pneumotropo. Si può riscontrare anche in altri organi
Inclusioni	—	—	Granulazioni intracellulari acidofile negli epitelii delle mucose
Culture del virus	Embrione di pollo	Embrione di pollo	Embrione di pollo
Tempo di uccisione degli embrioni da parte del virus	14-18 h	30-48 h	4-5 giorni
Adattamento del virus sui mammiferi	Cervello topo e ratto	Cervello criceto	—
Emoagglutinazione	Positiva col virus L'antisiero specifico inibisce l'emoagglutinazione	Positiva col virus L'antisiero specifico inibisce l'emoagglutinazione	Non si sa nulla in proposito nella letteratura
Ossido riduzione di alcuni coloranti	+	—	

asiatico) ma gradatamente attenuato. Il virus diluito a 1:80 (una parte di virus e ottanta parti di acqua distillata sterile) viene inoculato in uova al 9-10° giorno d'incubazione. L'embrione muore in genere alla 30-36esima ora, prima che muoia si preleva sterilmente il liquido allantoideo, dopo aver lasciato in frigorifero l'uovo per 15 minuti.

Il vaccino viene distribuito in ampolle contenenti $1/4$ di cm^3 rappresentante 500 dosi. Al momento dell'uso il contenuto viene diluito con 500 cc. di soluzione fisiologica sterile od acqua distillata, o acqua di rubinetto bollita, il miscuglio agitato vigorosamente costituisce il vaccino pronto per l'uso.

Tale vaccino viene inoculato per via sottocutanea o endomuscolare. E' preferibile praticare la vaccinazione per via endomuscolare, poichè è il metodo più rapido. La dose è di 1 cc., per polli, per i pulcini sotto le quattro settimane si usa la dose di 0,5 cc.

Qualsiasi vaccino diluito e non usato deve essere eliminato.

Esperienze eseguite a Muktuswar mostrano che l'immunità attiva viene conferita 48 h. dopo l'inoculazione, la durata dell'immunità è lunga. La vaccinazione è preventiva e non già curativa, per cui essa viene praticata su animali in buono stato di salute.

Dopo la vaccinazione i polli mostrano un'acuta sonnolenza dal 3-4° fino al 5-6° giorno. Una piccola percentuale dei vaccinati con virus asiatico può mostrare segni di rattrappimento o di paralisi, od anche fenomeni di torcicollo e tremito della testa. Tali animali devono essere separati e se i sintomi non regrediscono, sacrificati.

Nella maggior parte dei casi, però, tali sintomi scompaiono in dieciquattordici giorni. Se la vaccinazione è eseguita in galline da cova, la produzione delle uova diminuisce, per ritornare normale dopo 3 settimane dalla vaccinazione.

Roma, Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Microbiologia, 4 agosto 1949.

BIBLIOGRAFIA

- (1) DOYLE T. M., Journ. Comp Path. and Therap., 40, 114, 169, 1927..
 - (2) FINZI G., citato da Serra: «L'azione veterinaria», 107, 1941.
 - (3) CARPANO, L'azione veterinaria, 234, 1941.
 - (4) BIANCHI C., Giornale degli allevatori, 30 luglio VI, pag. 6.
 - (5) MANNINGER, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, 1938.
 - (6) BURNET F. M., Austral. J. exp. Path., 20, 81, 1942.
 - (7) BURNET F. M., B. Beveridge, J. McEvin, W.C. Boake, J. exp. biolog. and Med. Science., 23, 177-192, 1945.
 - (8) FLORMAN A. L., Proc. of the Soc. for exp. Biol. and Med. 64/4, 458-463-1947.
 - (9) CUNHA R., Weil M.R., D. Beard, A.R. Taylor, Sharp D.G., Beard J.W. - The Journ of Immunol. 69, 89, 1947.
 - (10) BURNET F. M., and Ferry J.D. - Brith. Journ. Exp. Path. 15, 56, 1934.
 - (11) BURNET F. M., Brith. Journ. Exp. Path. - 15, 52, 1943.
 - (12) TILLEY F. W., and Anderson W. A., Veterinary Med. - 42-6, 229-230, 1947.
 - (13) MANNINGER, sopra citato.
 - (14) PAGNINI U., L'azione veterinaria, 1942, pag. 281.
 - (15) SHINKIN N. I., The Brith. Journ. of ophthalmology, 30-5, 260-264, 1946.
 - (16) BURNET F. M., Med. Journ. Austral. - 2, 313-314, 1943.
 - (17) DE LAY, Science - 106, 545-546, 1947.
 - (18) LUSH D., Journ. Comp. Path. - 53, 157, 1943.
 - (19) HIRST G. K., Science - 1941, 94, 22.
 - (20) MOCLELLAND W., Hare H., Canadian Publ. Health J. - 1941, 32.
 - (21) LEPINE P., Santen V., Reinié L. - Annales de l'Inst. Pasteur. 1946, 523.
 - (22) BEACH J. R., J. Am. Med. Vet. Ass. - 851-857, 1944.
 - (23) BRANDLY C., Moses H., Jiones E. and Junghen E. - Am. Jour. of Veter Res. 1946, 307.
 - (24) REAGAN R., LILLIE M., Poeima L., Beneckner A. - Am. Jour. of Veter. Res. 1946, 136.
 - (25) KAPLAN M. M., and Scott R. E., Zooprofilassi - 1946, N. 6.
-