

Encephalitozoonosi del coniglio: correlazione tra lesioni renali macro-microscopiche e titolo anticorpale in conigli al macello

Tittarelli C., Gelmetti D., Rota Nodari S., Gibelli L., Lavazza A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna
"B. Ubertini", Brescia, Italy

Corresponding Author: Antonio Lavazza, Laboratorio di Microscopia Elettronica, Reparto di Virologia e Sierologia Specializzata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini", via Bianchi 7/9, Brescia, Italy - Tel. +39 030 2290298 - Fax: +39 030 2290623 - Email: antonio.lavazza@bs.izs.it

ABSTRACT: Encephalitozoonosis of rabbits: the relationship between macro-microscopic kidney lesions and antibody titers in rabbits at slaughterhouse. Encephalitozoonosis is a chronic parasitic infection caused by *E. cuniculi*, largely diffused in industrial rabbit farms in Italy. From 107 meat or adult rabbits taken at slaughterhouse, we sampled the kidneys and the blood in order to correlate macroscopic and microscopic lesions to anti-*E.cuniculi* antibodies determined using Carbon Immuno Assay (CIA) test. Over 85% of rabbits with lesions scoring from 1 to 4 resulted seropositive whereas only 12% of the animals without kidney lesions were positive. A good correlation was found between serological titers, ranging between 1/40 to 1/5120, and severity of lesions. The microscopic lesions reflected the severity of the infection, thus making possible a graduation system on the base of the various changes observed in the glomeruli and in the tubuli.

Key words: Rabbit, Slaughterhouse, CIA test, Kidney lesions.

INTRODUZIONE – *Encephalitozoon cuniculi* è un microsporidio, parassita obbligato intracellulare, di diverse specie di mammiferi (roditori, lagomorfi e carnivori). Può colpire anche i primati, rappresentando una potenziale zoonosi, in particolare in soggetti immunodepressi. L'infezione avviene per ingestione di alimenti contaminati o attraverso l'inalazione di spore e più spesso si sviluppa una forma subclinica ad andamento cronico o latente. Nell'infezione recente il protozoo presenta particolare tropismo per polmoni, rene e fegato, mentre in quella tardiva colpisce cuore, cervello e reni. I conigli generalmente sono asintomatici anche se sieropositivi; solo nel 12% dei casi si sviluppano disturbi neurologici e la mortalità è sporadica. In Italia il parassita è stato rilevato istologicamente nel 12,6% dei conigli regolarmente macellati e nel 24,4% quando sono inclusi anche quelli deceduti spontaneamente (Julini e Pellegrini 1981-2; Julini, 1983). Studi siero-epidemiologici condotti nel nord Italia hanno evidenziato sieroprevalenze variabili dal 6 al 97% in allevamenti industriali, del 21,4% in allevamenti rurali (Lavazza *et al.*, 1996; Saviotti *et al.*, 2000) e vicine al 60% in conigli da compagnia (Tittarelli *et al.*, 2008). Per meglio definire l'importanza di tale problematica negli allevamenti industriali e verificare il valore prognostico attribuibile all'esecuzione *in vitam* del Carbon Immuno Assay (CIA) test, si è deciso di effettuare un'indagine sierologica per *E.cuniculi* al macello e di mettere in relazione il titolo anticorpale in ciascun soggetto campionato con le lesioni renali macro e microscopiche.

MATERIALI E METODI – Tra ottobre e dicembre 2007, in un macello della provincia di Brescia sono stati selezionati in totale 107 conigli, di cui 103 da ingrasso e 4 femmine a fine carriera, provenienti da 11 diversi allevamenti di Lombardia e Veneto. In corrispondenza con il prelievo di sangue, raccolto in fase di iugulazione, sono stati prelevati i reni corrispondenti di ciascun soggetto. Le lesioni macroscopiche renali sono state distribuite in 5 classi (Fig. 1):

0 = assenza di lesioni;

1 = petecchie e soffiusioni emorragiche e/o presenza di piccole aree bianche isolate;

2 = macchie bianche diffuse;

3 = circoscritte aree di retrazione cicatriziale;

4 = estese aree di retrazione cicatriziale (“rene grinzo”) e presenza di cisti renali.



Figura 1 – Quadri macroscopici osservati al macello e classificati in base al tipo ed alla distribuzione delle lesioni. 0) assenti lesioni 2) macchie bianche diffuse 3) aree di retrazione cicatriziale 4) rene grinzo. *Le immagini b) e c) sono fornite dal Prof. A. Scala (Univ. Sassari).*

Entrambi i reni di ciascun animale sono stati conferiti refrigerati, sezionati perpendicolarmente al loro asse maggiore, ed una porzione di circa 1 cm è stata fissata in formalina tamponata al 10% ed inclusa in paraffina secondo le metodiche in uso. Sezioni di 4 μ m sono state colorate con ematossilina-eosina e con colorazione all'acido periodico di PAS. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 1800 rpm per 20 minuti ed il siero è stato testato mediante Carbon Immuno Assay-CIA (Waller, 1977) utilizzando un kit commerciale prodotto dalla Medicago AB, Uppsala, Sweden. Il titolo finale di un siero era definito come la diluizione (in base 2) alla quale si stima che il 50% dei microrganismi presenti risulti colorato con le particelle di carbone.

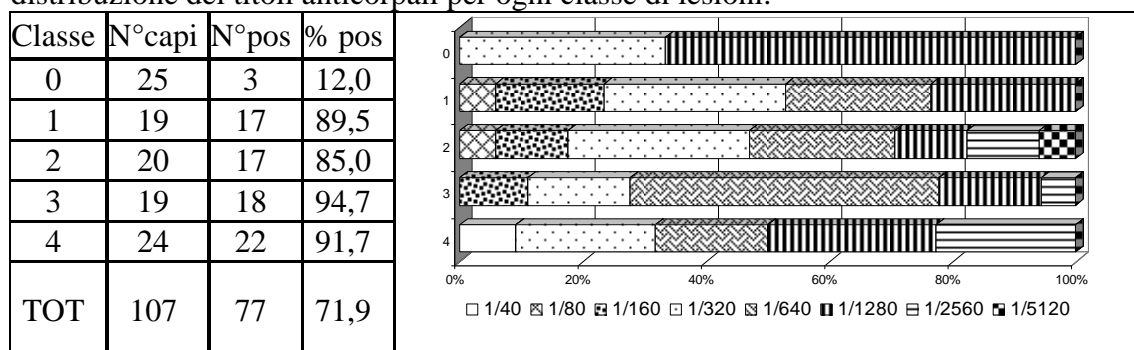
RISULTATI E CONCLUSIONI – Dei 107 conigli esaminati, 77 sono risultati sieropositivi con titoli variabili da 1/40 a 1/5120, indicando una sieroprevalenza del 71,9%, elevata se riferita all'età degli animali (80-95gg), ma coerente con il campione selezionato. Il confronto fra titolo sierologico e classe delle lesioni è riportato in tabella 1: i reni privi di lesioni corrispondevano in larga parte (88%) ad animali sieronegativi, mentre nelle altre classi la sieroprevalenza era superiore all'85%. In 8 casi, a lesioni macroscopiche e microscopiche evidenti corrispondeva una sieronegatività, indicando così una possibile eziologia di altra natura.

Istologicamente, le lesioni più consistenti erano a carico dell'interstizio, caratterizzate da nefrite interstiziale linfoplasmacellulare da lieve (34/107) ad intensa (52/107) con distribuzione da focale a multifocale. Nelle forme sub-acute e croniche era sempre osservabile sclerosi interstiziale di diversa intensità (53/107). La nefrosi era per lo più localizzata ai tubuli prossimali, con degenerazione torbido vacuolare dell'epitelio di rivestimento (57/107), dilatazione del lume, focali necrosi (11/107). I glomeruli mostravano lesioni lievi caratterizzate da iperemia, anse dilatate contenenti rari granulociti eterofili (18/107), glomeruliti mesangioproliferative di lieve entità (23/107). L'esame microscopico dei 25 reni di classe 0 evidenziava in 18 di essi iperemia

glomerulare e nefrite interstiziale da focale a multifocale di lieve entità riferibile a nefrite acuta. Nei reni dei 3 soggetti sieropositivi la nefrite interstiziale era intensa. Tutti i campioni di questo gruppo non mostravano fibrosi contribuendo a rendere difficile il riconoscimento delle lesioni macroscopiche. Nelle altre classi, fibrosi interstiziale, nefrosi e lesioni glomerulari erano frequentemente associate con distribuzione dell'infiltrato da focale a multifocale. La nefrite interstiziale, di grado moderato nella classe 1, diventava via via più marcata nelle altre classi. Nella classe 2 le lesioni erano caratterizzate da quadri di nefrite acuta e più frequentemente subacuta. Nelle classi 3 e 4 prevaleva la nefrite cronica con più evidenti aree di retrazione cicatriziale nella classe 4. La sierologia delle classi da 1 a 4 era molto variabile (Tab. 1), tuttavia si notava una certa correlazione diretta fra lesioni e titolo anticorpale.

In conclusione, sebbene la classificazione macroscopica delle lesioni sia correlata all'esperienza dell'operatore, vi è sempre ampia concordanza con il riscontro microscopico di nefrite. Al tempo stesso la classe 0 è quella più a rischio che va maggiormente indagata in quanto, in assenza di lesioni riconoscibili e con riscontro sierologico negativo, possono tuttavia già essere presenti quadri iniziali di patologia renale. Tali animali sono quindi potenzialmente eliminatori e potrebbero favorire la diffusione dell'infezione in allevamento. Nei campioni non sono stati osservati i microsporidi ed a tal fine si prevede di approfondire l'indagine con colorazione immuno-istochimica. Tuttavia la correlazione tra nefrite e presenza di anticorpi in 77 dei 107 campioni esaminati suggerisce che la nefrite osservata era ascrivibile ad *E. cuniculi*.

Tabella 1 – Correlazione tra gravità delle lesioni macroscopiche e titoli anticorpali e distribuzione dei titoli anticorpali per ogni classe di lesioni.



BIBLIOGRAFIA – **Julini**, M., 1983. Ulteriori indagini sulla incidenza della encefalitozoonosi nei conigli. Ann. Fac. Med. Vet. Torino, 29:98-105. **Julini**, M., Pellegrini, N., 1981-82. Incidenza della encefalitozoonosi nei conigli macellati. Ann. Fac. Med. Vet. Torino, 28:1-11. **Lavazza**, A., Tinelli, F., Zanon, F., Massirio, I., 1996. A seroepidemiological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in different Italian rabbitries. In: Proc. 6th World Rabbit Congress. Toulouse, France, vol. 3, pp 81-87. **Saviotti**, M., Tamba, M., Gallazzi, D., Lavazza, A., 2000. Further data on the diffusion of *Encephalitozoon cuniculi* in Italian rabbitries. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, pp. 355-362. **Tittarelli**, C., Tranquillo, V., Luppi, A., Nassuato, C., Grilli, G., Lavazza, A., 2008. Indagine sierologica per *Encephalitozoon cuniculi* in conigli da compagnia: osservazioni preliminari. In: Proc. X Congr. Naz. S.I.Di.L.V., Alghero, Italy, pp. 298-299. **Walzer**, T., 1977. The india-ink immunoreaction: a method for rapid diagnosis of Encephalitozoonosis. Lab. Anim. 11:93-97.