

# VACCINAZIONE ANTIVAIOLOSA D'EMERGENZA IN *SERINUS CANARIA* (AVES) DURANTE L'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA ED APPROCCIO TERAPEUTICO CON ISOPRINOSINA

## EMERGENCY VACCINATION AGAINST FOWL POX AND THERAPY WITH ISOPRINOSINE IN *SERINUS CANARIA* (AVES) DURING REPRODUCTIVE ACTIVITY

GIANLUCA TODISCO DVM - ANTONIO CAMARDA<sup>1</sup> DVM, Prof. Ass. - ELENA CIRCELLA<sup>1</sup> DVM  
LUCA CAMPANELLI DVM - DOMENICO ROBBE DVM, Prof. Ass.

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Teramo

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità, Patologia, Farmaco-Tossicologia e Benessere degli Animali, Università degli Studi di Bari

### Riassunto

Il vaiolo aviario è una delle più gravi e frequenti malattie infettive ad eziologia virale del canarino. Nel caso clinico descritto la malattia si è presentata nella forma cutanea e respiratoria, manifestandosi nella fase iniziale con congiuntivite, vescicole e pustole intorno agli occhi ed alla commessura del becco. Insorto il sospetto, la diagnosi è stata confermata mediante isolamento virale su CAM di uova di pollo con evidenziazione al microscopio elettronico di particelle virali riferibili a poxvirus.

L'intero parco riproduttori dell'allevamento, suddiviso in due gruppi, il primo di 10 coppie ed il secondo di 9, è stato sottoposto a vaccinazione d'emergenza con un vaccino del commercio; inoltre, gli animali del primo gruppo sono stati trattati anche con isoprinosina per aumentare l'efficienza del sistema immunitario. Per ogni coppia di canarini di entrambi i gruppi, sono stati considerati, in prima (dicembre-gennaio) e seconda (febbraio-marzo) covata, il numero di uova deposte, il numero di uova fecondate, il numero di pulcini nati ed il numero di pulcini svezzati. Nessun canarino ha presentato effetti collaterali negativi in seguito alla somministrazione sia del vaccino che dell'isoprinosina. Durante il periodo di osservazione si è assistito ad un miglioramento delle performances riproduttive in seconda covata, che ha portato ad un incremento significativo del numero dei pulli svezzati. I risultati migliori sono stati ottenuti nel gruppo di canarini sottoposti al trattamento con isoprinosina.

### Summary

The fowl pox is a severe and common viral disease of the canary birds. In the following report both cutaneous and respiratory shapes from a Fife and Gloster canary breeding were observed. The disease was responsible of conjunctivitis, vesiculæ and pustulæ all around the eyes and the beak; after, a distribution of the lesions as scabs on the toes was registered too. The diagnosis was confirmed by viral isolation on CAM of chicken embryos; characteristic viral pox particles were identified from scabs with electron microscope.

All the canary breeders (a total of 20 couples) were immunized using a commercial vaccine (Poulvac<sup>®</sup> canary pox FOI, Fort Dodge Animal Health). The first group of 10 couples was also treated with Isoprinosine, while the other 10 couples were used as control group. For each couple of both groups, the number of laid eggs, the number of fertilized eggs, the number of chicks born and the number of chicks weaned were evaluated during the first (December-January) and second (February-March) brood period. None of the canaries showed effects after vaccination and treatment with isoprinosine. The reproductive performances and particularly the number of weaned chicks, improved significantly during the second brood period in both groups; nevertheless the group treated with isoprinosine showed an higher number of weaned chicks.

### INTRODUZIONE

Il vaiolo aviario è una malattia infettiva e contagiosa ad eziologia virale descritta in più di 60 specie di uccelli selvatici e domestici. Colpisce indifferentemente maschi e fem-

mine di qualunque età ed è cosmopolita<sup>1</sup>. Nel canarino è grave, frequente e rappresenta un pericolo sempre incombente in tutti gli allevamenti<sup>2</sup>. L'agente eziologico appartiene al genere *Avipoxvirus*, famiglia *Poxviridae* e viene denominato come *Avipox serinae*<sup>3</sup>. Il virus ha DNA bicatenario, forma di parallelepipedo e dimensioni di 258 x 354 nm.

La trasmissione della malattia si realizza attraverso il contatto diretto con animali ammalati o portatori sani; il

<sup>1</sup> "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 13/11/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 28/11/2006".

virus può essere veicolato da acari, zanzare, oppure, indirettamente, attraverso cibo e acqua di bevanda contaminati<sup>4</sup>. Sembra che i mammiferi non siano in grado di veicolare attivamente il virus del vaiolo aviario<sup>4</sup>. Questo penetra nell'organismo facilmente attraverso microferite della cute o delle mucose, per via orale o aerogena<sup>2</sup>. La mucosa orale e quella delle prime vie aeree sono più sensibili all'infezione iniziale, anche in assenza di apparenti soluzioni di continuità<sup>1</sup>. Dopo un'incubazione variabile da 4 a 30 giorni, il vaiolo può manifestarsi in quattro diverse forme cliniche: iperacuta, respiratoria, difterioide e cutanea<sup>3</sup>; quest'ultima è considerata rara nella sua forma generalizzata<sup>3</sup>.

La malattia in allevamento è di difficile controllo per la indisponibilità di presidi terapeutici efficaci. Il virus infatti, è insensibile al trattamento con antibiotici i quali vengono usati per il contenimento delle infezioni secondarie frequenti durante l'evolversi del focolaio.

Tali considerazioni hanno portato gli AA ad indagare sull'efficacia dell'isoprinosina nel trattamento farmacologico di questa patologia del canarino. L'isoprinosina è una molecola idrosolubile, priva di tossicità e con proprietà antivirali e immunomodulanti usata routinariamente per il trattamento di infezioni virali in campo umano. Questo farmaco, infatti, attivo sia nei confronti di DNA virus che RNA virus, è dotato di una discreta attività terapeutica, ma non è in grado di prevenirne l'infezione; in particolare, inibisce la replicazione virale e stimola le risposte immunitarie dell'ospite. In vitro è stata evidenziata un'azione dose dipendente, mediante la stimolazione della produzione di immunoglobuline da parte dei linfociti B<sup>5</sup>. Negli uccelli l'isoprinosina induce un aumento della produzione di interferone, e la sua efficacia, sarebbe proprio legata ad un effetto sinergico tra il farmaco stesso e l'interferone<sup>6</sup>. Si segnala, ancora, un'azione positiva dell'isoprinosina sulla reattività dei linfociti, sullo sviluppo degli organi immunocompetenti e sull'attività della ceruloplasmina nel liquido allantoideo in embrioni di pollo<sup>7</sup>. Nei canarini, l'isoprinosina migliora le performances riproduttive aumentando la percentuale di schiusa e la resistenza dei pulli alle infezioni pediatriche da germi opportunisti, spesso causa di mortalità neonatale<sup>8</sup>.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare se la vaccinazione d'emergenza da sola o in associazione ad isoprinosina è in grado di favorire la regressione delle manifestazioni cliniche in corso di focolaio di difterovaiolo aviario nel canarino. Trattandosi di animali in attività riproduttiva sono stati altresì considerati anche alcuni parametri (n° di uova deposte, n° di uova fecondate, n° di nati e n° di pulli svezzati) per valutare se la vaccinazione e il trattamento con isoprinosina influenzano la produttività degli animali in questo particolare momento funzionale.

## MATERIALI E METODI

Nel mese di gennaio 2006, in un allevamento di canarini da esposizione di razza Fife e Gloster, costituito da 20 coppie totali, di età compresa tra 8 e 18 mesi, non vaccinati contro il vaiolo e già uniti per la riproduzione, è stato osservato un episodio di malattia riconducibile, per i caratteri clinici ed anatomopatologici delle lesioni, a difterovaiolo aviario.

Inizialmente la malattia si è manifestata in tre soggetti, alloggiati in due gabbie diverse, i quali presentavano congiun-

tivite siero-catarrale monolaterale (Fig. 1) associata a lieve depressione del sensorio. Dopo tre giorni, in due di questi canarini, la congiuntivite esitò in ascesso peribulbare e sinusite monolaterale (Fig. 2). Nel volgere di pochi giorni gli stessi soggetti presentavano lesioni nodulari giallastre sulla cute alla base inferiore del becco (Fig. 3), e sulle dita (Fig. 4), mentre lesioni analoghe, ma più piccole, si osservavano intorno all'occhio già coinvolto dalla congiuntivite (Fig. 5). Dopo circa una settimana, altri quattro canarini presentavano depressione del sensorio, iporessia, dispnea, congiuntivite e croste giallastre. Due di questi soggetti, furono allontanati dal gruppo; gli altri, già in riproduzione, furono sottoposti a vaccinazione d'emergenza con un vaccino del commercio a virus vivo attenuato del vaiolo del canarino, ceppo KP1 (Poulvac® canary pox FOI, Fort Dodge Animal Health). Al



FIGURA 1 - Congiuntivite monolaterale.



FIGURA 2 - Ascesso peribulbare e sinusite monolaterale.



FIGURA 3 - Lesione nodulare crostosa alla base del becco.

trattamento immunizzante furono associate quotidianamente disinfezioni locali delle lesioni con una soluzione diluita 1:1 di iodopovidone e soluzione salina 0,9%. I canarini furono vaccinati iniettando il vaccino a livello della cute del patagio con un particolare ago a doppia punta<sup>9</sup>. Dopo 7 giorni la presenza di due piccole papule nel punto di inoculo dimostrava il buon esito della vaccinazione (Fig. 6). Gli uccelli allontanati e non vaccinati sono stati sottoposti ad accertamenti diagnostici per confermare il sospetto di vaiolo. Da questi soggetti sono state prelevate le croste e inviate all'Istituto Zooprofilattico di Teramo. Dal materiale sospetto è stato ottenuto un omogenato successivamente inoculato sulla membrana corionallantoidea (CAM) di uova embrionate di pollo a 10 giorni di incubazione. In ottava giornata le uova hanno manifestato caratteristici *pox* sulle CAM in forma disseminata, metastatica e focale (Fig. 7) su cui è stato evidenziato il virus del diftero-vaiolo aviare; contestualmente, sulle croste raccolte dai canarini ammalati è stato effettuato un esame al microscopio elettronico presso la Sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'E-



FIGURA 4 - Lesione nodulare crostosa sul 2° dito dell'arto pelvico.



FIGURA 5 - Iniziali lesioni nodulari intorno all'occhio.

milia Romagna a seguito del quale è stato possibile evidenziare caratteristiche particelle virali riferibili a pox-virus (Fig. 8). Dopo pochi giorni uno dei due canarini precedentemente allontanati è deceduto. All'esame autoptico il soggetto presentava emorragia alla commessura del becco (Fig. 9) e lesioni a carico dell'apparato respiratorio caratterizzate da infiammazione della mucosa tracheale (Fig. 10), congestione ed edema polmonare (Fig. 11).

Gli esami batteriologici effettuati a partire dagli organi del soggetto deceduto non hanno consentito l'isolamento di agenti patogeni specifici.

Tutti i soggetti, rimasti in allevamento compresi gli asintomatici, sono stati suddivisi in due gruppi: il gruppo A composto da 10 coppie trattate con isoprinosina (Viruxan® sciroppo Sigma tau, 6g/120 ml) e il gruppo B, composto da 9 coppie non trattate e costituente il gruppo controllo. Per la somministrazione l'isoprinosina è stata omogeneizzata in uovo intero di gallina bollito in acqua per 20 minuti. In particolare il Viruxan® è stato impiegato alla dose di 9 ml (pari a 450 mg di isoprinosina) per 180 g di uovo cotto, il quale, precedentemente, era stato ridotto in poltiglia per facilitarne l'omogeneizzazione con il farmaco e l'assunzione da parte dei volatili. L'alimento medicato è stato somministrato ai 20 canarini tutti i giorni nei mesi di gennaio e febbraio durante la nascita dei pulli della prima covata. Questa quantità di alimento medicato veniva mediamente consumata in 24 ore e, pertanto, rinnovata



FIGURA 6 - Patagio iperemico e papule nel punto d'iniezione del vaccino.

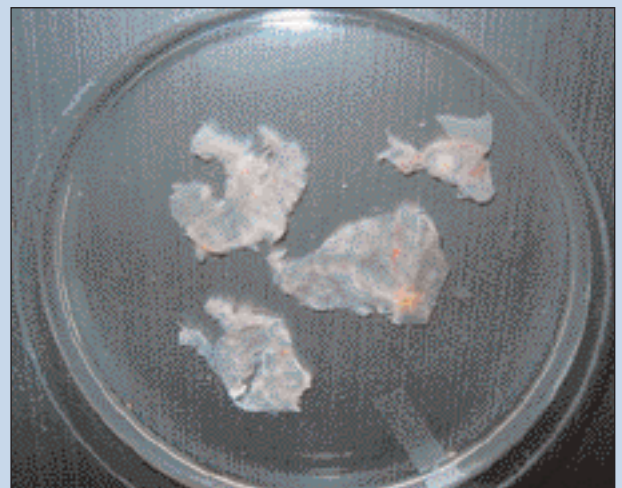


FIGURA 7 - Lesioni vaiolose (*pox*) su CAM.

quotidianamente. Ciascun canarino trattato ha assunto mediamente una dose giornaliera di 22,5 mg di isoprinosina. Oltre all'uovo medicato, ai canarini veniva anche fornita ad libitum, una miscela composta per il 70% da semi di scagliola e per il 30% da estrusi. Il cibo fornito agli uccelli era anche addizionato con un integratore di vitamine A, D ed E (Transivit – Ravasi) lasciato a libera disposizione.

Le infezioni batteriche secondarie insorte in alcuni soggetti di entrambi i gruppi sono state trattate con difloxacin (Dicural® 50 mg/ml soluzione iniettabile per bovini e cani, Fort Dodge Animal Health) alla dose di 200 mg per litro d'acqua di bevanda rinnovata giornalmente per 15 giorni.

Per ogni coppia di canarini di entrambi i gruppi, sono stati considerati, in prima (dicembre-gennaio) e seconda (febbraio-marzo) covata, il numero di uova deposte, il numero di uova fecondate, il numero di pulcini nati e il numero di pulcini svezzati. I dati relativi al numero di uova deposte e feconde, al numero di nati e svezzati in due covate successive, nei due gruppi, sono stati sottoposti a test di Student eteroschedastico.

## RISULTATI

I risultati della sperimentazione sono riportati nella Tabella 1 e rappresentati graficamente nell'istogramma I.

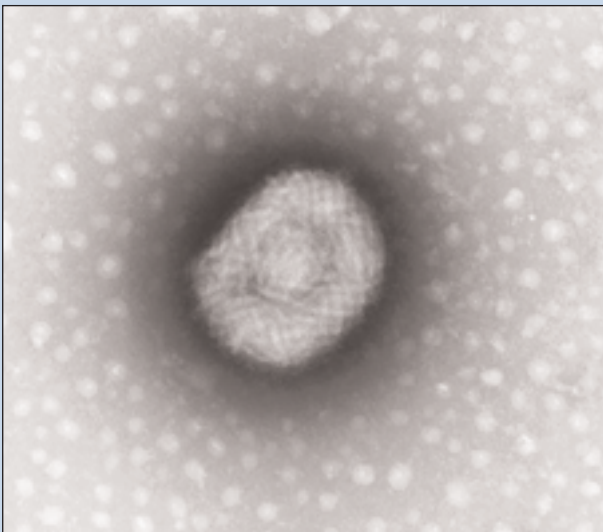


FIGURA 8 - Avipox serinae al microscopio elettronico.



FIGURA 9 - Emorragie alle commisure del becco.



FIGURA 10 - Infiammazione della mucosa tracheale.

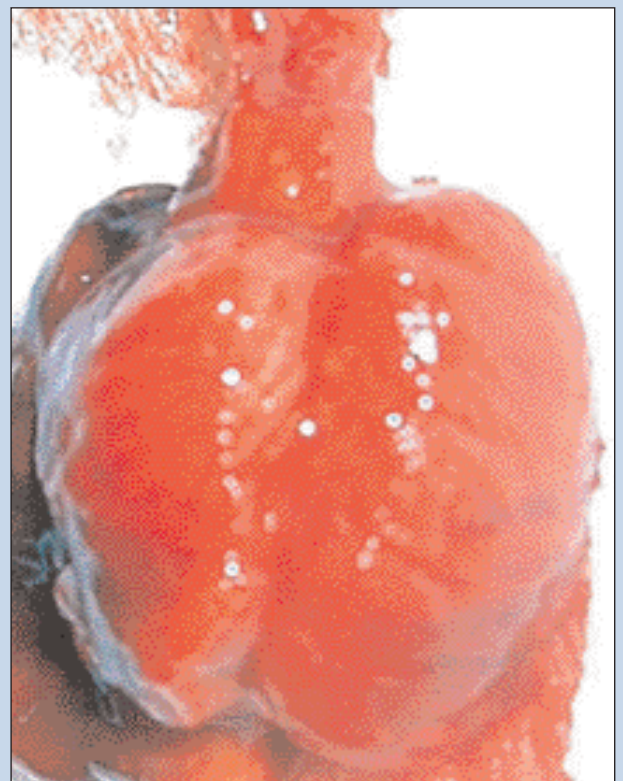


FIGURA 11 - Congestione ed edema polmonare.

Tabella 1  
Valore numerico, valore medio per coppia (tra parentesi) e valore percentuale dei parametri riproduttivi considerati in prima e seconda covata nel gruppo trattato con isoprinosina e nel gruppo controllo

GRUPPI	1ª COVATA				2ª COVATA			
	<i>n. uova deposte</i>	<i>n. uova fecondate</i>	<i>n. nati</i>	<i>n. svezzati</i>	<i>n. uova deposte</i>	<i>n. uova fecondate</i>	<i>n. nati</i>	<i>n. svezzati</i>
<b>A (isoprinosina)</b>	37 (3,7)	22 (2,2) 59,4%	16 (1,6) 72,7%	2 (0,2) 12,5%	37 (3,7)	24 (2,4) 64,8%	17 (1,7) 70,8%	15 (1,5) 88,2%
<b>B (controllo)</b>	36 (4)	21 (2,3) 58,3%	15 (1,7) 71,4%	0 (0,0) 0%	35 (3,9) 60%	21 (2,3) 71,4%	15 (1,7) 33,3%	5 (0,6)

Nessun canarino ha presentato effetti collaterali negativi in seguito alla vaccinazione d'emergenza ed alla somministrazione dell'isoprinosina e della difloxacin. La vaccinazione non ha aggravato le manifestazioni cliniche degli animali sintomatici e non ha causato la comparsa di sintomi in animali apparentemente sani.

Il trattamento con isoprinosina non ha influenzato negativamente il numero delle uova deposte né il numero dei nati. Si è registrato, invece, nel gruppo trattato, un incremento, in seconda covata rispetto alla prima, del numero delle uova fecondate (64,8% vs 59,4%) sia pure non statisticamente significativo. L'incremento del numero dei pulli svezzati, nella seconda covata, al contrario, si è dimostrato altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ).

I risultati ottenuti nel gruppo controllo sono sovrapponibili a quelli del gruppo trattato sia per quanto riguarda le uova deposte, quelle feconde ed il numero dei nati.

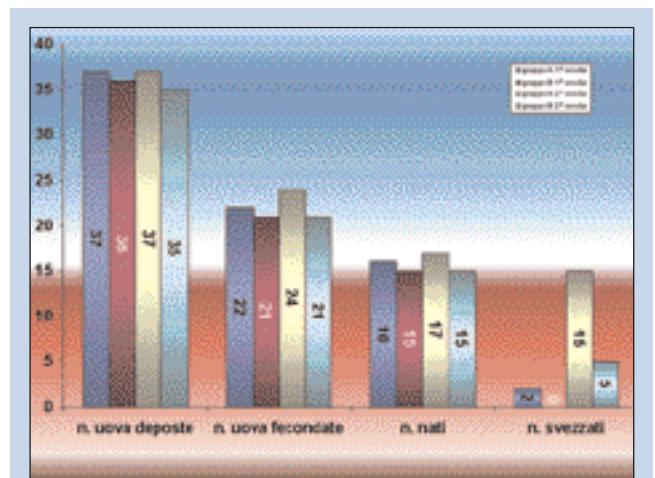
Anche in questo gruppo infatti il numero dei pulli svezzati rispetto alla prima covata, è significativamente più alto ( $p \leq 0,01$ ). Confrontando tra loro i due gruppi appare evidente che in seconda covata il numero dei pulli svezzati appartenente ai soggetti trattati con isoprinosina è notevolmente più alto ( $p \leq 0,01$ ).

## CONCLUSIONI

A seguito della vaccinazione d'emergenza e dell'allontanamento degli animali clinicamente ammalati si è ottenuto un efficace controllo del focolaio di malattia. Gli animali vaccinati, inoltre, non hanno manifestato effetti collaterali anche in corso di evidenti manifestazioni cliniche di vaiolo aviario.

Il gruppo trattato con isoprinosina in associazione con il vaccino del difterovaiolo ha mostrato un aumento notevole dei risultati riproduttivi. In particolare, l'efficacia del trattamento sembra essersi espressa soprattutto attraverso l'aumento significativo del numero dei pulli svezzati e, sia pure in misura minore, delle uova fecondate. Al contrario, non sembrano essersi verificati effetti sul numero delle uova deposte e sul numero dei nati.

Durante la sperimentazione le infezioni batteriche secondarie sono state efficacemente controllate con la difloxacin. Il trattamento generalizzato dei gruppi di tipo metafilattico con questo antibiotico ha probabilmente impedito la comparsa di ulteriori complicazioni batteriche secondarie legate all'infezione virale.



Istogramma I - Rappresentazione grafica dei valori riportati in tabella 1.

I risultati ottenuti nella prova descritta riflettono, nei canarini, quanto riportato da Malavzewska et al.<sup>7</sup>, nei polli. Questi AA ritengono che l'aumento delle prestazioni produttive degli animali siano da ricondurre ad un potenziamento dei meccanismi di difesa immunitari locali e sistemici della madre e ad una maggiore efficienza degli organi immunocompetenti del pulcino.

È ipotizzabile inoltre, che la vaccinazione d'urgenza potrebbe aver contribuito a proteggere in maniera specifica gli animali impedendo la diffusione della malattia nel gruppo. In questo senso potrebbe essere interpretato l'aumento, nella seconda covata, del numero dei pulcini svezzati nel gruppo controllo.

Non è escluso, pertanto, che la maggiore funzionalità del sistema immunocompetente negli animali trattati con isoprinosina abbia determinato un potenziamento dell'immunità passiva, abitualmente scarsa in soggetti immunizzati con vaccini vivi attenuati come nel caso del difterovaiolo, attraverso il passaggio di anticorpi dalla madre all'uovo fecondato. Durante lo sviluppo dell'ovocellula e dell'embrione, infatti, in condizioni fisiologiche, si realizza un trasferimento attivo di anticorpi materni nell'epitelio follicolare con accumulo nel sacco vitellino<sup>10</sup>. Questi anticorpi, sia specifici che aspecifici, trasferiti all'embrione durante il suo sviluppo, contribuiscono ad aumentare la resistenza alle malattie dei pulcini e si traduce in una riduzione della mortalità neonatale e perinatale nei pulli come os-

servato nel gruppo trattato con isoprinosina<sup>11</sup>.

In conclusione, la vaccinazione con virus vivo del vaiolo del canarino, ceppo KP1, ha confermato di essere un valido presidio per la profilassi del vaiolo aviare nel canarino utilizzabile, in caso di necessità, anche per vaccinazioni d'urgenza. La vaccinazione non ha indotto l'insorgenza di segni clinici di vaiolo nei canarini apparentemente sani venuti in contatto con il virus di campo e non ha influenzato negativamente le performances riproduttive. Il trattamento con difloxacin ha prevenuto l'insorgenza di infezioni secondarie e si è dimostrato adeguato nella loro terapia nei soggetti ammalati. L'isoprinosina in associazione al vaccino ha dimostrato di essere una molecola efficace nel migliorare le performances riproduttive dei canarini probabilmente a causa dell'aumentata efficienza del sistema immunitario materno e degli organi immunocompetenti dei pulcini, come evidenziato anche in ricerche analoghe condotte sugli embrioni di pollo<sup>7</sup>.

## Ringraziamenti

*Si ringraziano il Dr. Antonio Lavazza della Sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna per l'evidenziazione del virus al microscopio elettronico e la Dr.ssa Ornella Barbarito (DVM, Texas) per la preziosa collaborazione.*

## Parole chiave

*Canarino, vaiolo aviare, vaccino, isoprinosina, riproduzione.*

## Key words

*Canary, fowl pox, immunization, isoprinosine, reproduction.*

## Bibliografia

1. Tripathy DN, Reed WM: Pox in: Diseases of poultry. 10th edition, edited by B.W. Calnek, 1997, pp 643-655.
2. Farina R, Scatozza F: Trattato di malattie infettive degli animali. 2a edizione, UTET, 1998, pp 485-489.
3. Dorrestein GM, Kummerfeld N: Uccelli da gabbia e da voliera (canori) in: Medicina e chirurgia dei nuovi animali da compagnia. Vol. 1° (uccelli), ed. UTET, 2001, pp 17-19.
4. Castrucci G: Poxviridae in: Infezioni da virus degli animali domestici. 2a edizione, Società Editrice Esculapio, Vol. 2, 1998, pp 105-124.
5. Glasky AJ, Kestelin J, Romero M: Isoprinosine: a clinical overview of an antiviral immunomodulating agent. 7° Int. Congr. Pharmacol. Paris; 1978.
6. Malavzewska J, Rotkiewicz Z: Effect of Methosoprinol on virus replication in cell cultures. Polish Journal of Veterinary Sciences, 7 (2): 97-102, 2004.
7. Malavzewska J, Rotkiewicz Z, Siwicki AK: Effect of Methosoprinol and KLP-602 on the development of immunocompetent organs and selected biochemical indices of the allantoic fluid of chickens embryos. Polish Journal of Veterinary Sciences, 6 (3): 21-24, 2003.
8. Campanelli L, Manca R, Robbe D, Sciorsci RL: Impiego dell'Isoprinosina per il miglioramento dell'attività riproduttiva in *Serinus canaria*. Atti del 3° Conv. Naz. della Società Italiana di Riproduzione Animale, Roma, 123-126, 2005.
9. Conzo G: Medicina degli uccelli da gabbia. Ed agricole, Bologna, 2001, pp 262-264.
10. Li X, Nakano T, Sunwoo HHM, Paek BH, Chae HS, Sim JS: Effect of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. Poultry Science, 77, 266-270, 1998.
11. Rehmani SF, Firdous S: Passivity immunity in chicks from laying flock vaccinated with the mukteswar strain of Newcastle disease virus. Preventive veterinary medicine, 23, 111-118, 1995.