

CLOSTRIDIOSI IN SALA PARTO: DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO DALL'INSORGENZA ATIPICA

CLOSTRIDIOSIS IN THE FARROWING ROOM: A CLINICAL CASE REPORT WITH AN ATYPICAL ONSET

RAFFI V.¹, MAZZONI C.¹, ROSIGNOLI C.², BONILAURI P.², SPAGGIARI B.,²
GELMETTI D.², GIBELLI L.², MAIOLI G.², FACCINI S.², DOTTORI M.², LUPPI A.²,
TONON F.¹.

¹ *Libero professionista;*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna.*

Parole chiave: *Clostridium perfringens*, suinetti, diarrea emorragica

Keywords: *Clostridium perfringens*, piglets, haemorrhagic diarrhea

RIASSUNTO. Nel presente lavoro gli Autori riportano la comparsa di una sindrome caratterizzata da morte entro dodici ore dall'insorgenza dei sintomi, in numerose nidiatae di suinetti lattanti di circa un giorno di vita in un allevamento suino del Nord Italia. I sintomi clinici erano caratterizzati da ittero, apatia e diarrea e l'esame necroscopico, eseguito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER), sezione di Reggio Emilia, evidenziava quadri degenerativi epatici con necrosi parenchimali ed un'enterite necrotico-emorragica al piccolo intestino. Sono state condotte indagini tossicologiche sul mangime somministrato alle scrofe per la ricerca di micotossine con esito negativo. *Clostridium perfringens* è stato isolato dal piccolo intestino (1×10^7 ufc di *C. perfringens* per ogni grammo di contenuto intestinale) di diversi suinetti sottoposti ad esame necroscopico. La successiva genotipizzazione tramite multiplex PCR, eseguita presso la sezione di Mantova dell'IZSLER, ha identificato l'agente eziologico come portatore dei geni codificanti per le tossine α e $\beta 2$. L'esame istologico ha evidenziato quadri di degenerazione epatica torbido-vacuolare, di enterite necrotica al piccolo intestino e la presenza di numerose colonie di batteri gram-positivi sporigeni nel lume intestinale. La soluzione del problema è stata ottenuta attraverso il trattamento terapeutico con un macrolide long acting in tutti i suinetti nelle prime dodici ore dopo la nascita.

ABSTRACT. In this work the Authors described a syndrome in several suckling piglet broods (one-day old) occurred in a herd in the Northern Italy and characterised by death 12 hours after the onset of clinical signs. Clinical signs were characterised by jaundice, lethargy and diarrhea. Dead animals submitted for necropsy to IZSLER, Reggio Emilia Laboratory, showed good nutritional condition, necrosis of small intestine mucosa and liver degeneration with foci of parenchymal necrosis. Sow feed micotoxin toxicological investigations were carried out to elucidate the nature of liver degeneration with negative results. *Clostridium perfringens* was isolated from the small intestine of several piglets (1×10^7 ufc of *C. perfringens* from each gram of intestinal content). In Mantova laboratory (IZSLER) genes for toxins α and $\beta 2$ were detected using a multiplex polymerase chain reaction method from *C. perfringens* isolated. Histological examination of samples collected during the necropsy showed vacuolar liver degeneration, necrotic enteritis and multiple gram-positive, spore-forming bacterial colonies in the lumen. The syndrome did not appear to be related to dietary or any other specific management factors. A long acting macrolid administer to piglets in the first twelve hours after the birth let a complete solution of the syndrome.

INTRODUZIONE

I clostridi sono batteri Gram positivi, sporigeni e anaerobi obbligati. Le caratteristiche peculiari dei microrganismi appartenenti a questo genere sono rappresentate dalla capacità di produrre tossine, che a seconda del tipo sono in grado di provocare gravi danni tissutali e risultano essere i fattori determinanti nella patogenesi della malattia.

Nell'allevamento suino risultano di fondamentale importanza le forme enteriche sostenute da *Clostridium perfringens* tipo A e C e *Clostridium difficile* che colpiscono principalmente i soggetti giovani, con sistema immunitario immaturo, provocando gravi forme cliniche che possono concludersi con la morte dell'animale.

Clostridium perfringens viene considerato una delle principali cause di enterite negli animali domestici, in particolare l'infezione sostenuta da *Clostridium perfringens* tipo C è diffusa a livello mondiale e colpisce principalmente i suinetti durante la prima settimana di vita provocando un'enterite necrotico-emorragica, spesso ad esito fatale (Taylor D.J. et Bergeland M.E., 1996; Nigrelli A.D., 2009).

La malattia può presentarsi con diverse forme cliniche: per-acute, acuta, sub-acuta e cronica.

Nella forma per-acute colpisce i suinetti nelle prime 48 ore dalla nascita. Gli animali sviluppano una diarrea emorragica che li porta rapidamente a morte. In alcuni soggetti la morte si verifica, addirittura, prima della comparsa di diarrea e la carcassa di questi si presenta generalmente in buone condizioni generali.

Nella forma acuta i soggetti colpiti sopravvivono almeno due giorni dopo la comparsa dei sintomi e perciò la mortalità inizia dal terzo giorno di vita. Durante il decorso clinico le feci si presentano rosso-brunastre e contengono frustoli necrotici grigiastri.

Nella forma sub-acuta i suinetti presentano una diarrea persistente non emorragica che li porta a morte dopo un deperimento progressivo nell'arco di 5-7 giorni. Le feci, inizialmente giallastre, diventano successivamente liquide e chiare e contengono sia coaguli che frustoli necrotici.

La forma cronica colpisce generalmente suinetti di una o due settimane, ed è caratterizzata da una diarrea persistente con feci mucose e giallo-grigiastre che in alcuni casi formano delle caratteristiche concrezioni essiccate che ricoprono la coda. La morte può sopravvenire dopo diverse settimane, in ogni caso la crescita dei suinetti colpiti risulta gravemente penalizzata (Songer J.G. et al., 2005).

Le lesioni anatomopatologiche si riscontrano principalmente nel piccolo intestino, in particolare nel digiuno, anche se nei casi più gravi possono interessare l'intestino *in toto*. La mucosa intestinale presenta una colorazione rosso-nerastra e si presenta rivestita da pseudomembrane che microscopicamente appaiono costituite da cellule epiteliali necrotizzate, cellule infiammatorie, fibrina e un numero variabile di bacilli. Solitamente si osserva una estesa necrosi emorragica a carico della mucosa come pure della sottomucosa e della tonaca muscolare e la presenza di essudato emorragico nel lume intestinale.

L'esame culturale evidenzia generalmente un'elevata concentrazione di *C. perfringens* nel contenuto intestinale (Okazaki Y. et al., 1993; Songer J.G. and Uzal F.A., 2005).

Per la diagnosi di enterite da *Clostridium perfringens* è importante valutare il quadro sintomatologico, le lesioni anatomopatologiche ed i quadri microscopici. Le caratteristiche di riferimento risultano essere la diarrea emorragica nei lattonzoli, il tasso di mortalità riscontrato e la presenza di lesioni circoscritte di tipo necrotico-emorragico a livello di piccolo intestino (Taylor D.J. et Bergeland M.E., 1996; Sanz M.G. et al. 2005). La diagnosi viene confermata dall'isolamento e dalla quantificazione dell'agente eziologico, nonchè dalla dimostrazione delle specifiche tossine nel contenuto intestinale (Le Guennec J. et al., 2003). Tuttavia occorre sottolineare come non sia sempre possibile riscontrare la tossina preformata a causa della sua labilità alle proteasi (Taylor D.J., 2003).

Più recentemente sono stati individuati come responsabili di forme enteriche nei suinetti in sala-

parto anche ceppi di *C. perfringens* tipo A produttori di tossina β 2. Le lesioni anatomopatologiche si possono presentare con livelli di gravità variabile e in taluni casi è possibile ritrovare quadri molto simili a quelli descritti per le infezioni da *C. perfringens* tipo C (Songer J.G. et al., 2004; Songer J.G. e Uzal F.A. 2005; Nigrelli A.D. 2009).

Nel presente lavoro si è ritenuto interessante riportare un caso di clostridiosi enterica in suinetti sottoscrofa, caratterizzato da un decorso e da quadri clinici ed anatomopatologici per alcuni aspetti atipici e di difficile interpretazione.

MATERIALI E METODI

Allevamento

Azienda suinicola collocata nella Pianura Padana, costituita da 530 scrofe di genetica ibrida inglese, gestita in banda bi-settimanale e a ciclo aperto. La rimonta è interna e il nucleo delle Gran Parentali viene ringiovanito annualmente grazie all'acquisto, in un unico conferimento, di scrofette di 7 kg di peso provenienti da nuclei ad elevato standard sanitario. Una banda di suinetti svezzati ogni 4 viene mantenuta in azienda sino al peso di 30kg, mentre le altre 3 vengono vendute al termine della lattazione ad un peso medio di circa 6,4 Kg capo.

Allo svezzamento le scrofe vengono alloggiare in gabbie gestazione, dove, dopo essere state stimolate e fecondate in presenza del verro, rimangono per alcune settimane. Fra il 21° ed il 28° giorno dall'inseminazione viene effettuata la diagnosi ecografica di gravidanza, a cui segue la fase di gestazione in box multipli della capacità massima di 8 capi. Circa 5 giorni prima della scadenza del termine della gestazione, le scrofe vengono trasferite nelle gabbie parto. La lattazione, così come previsto dalla rigidità del sistema in banda bisettimanale, è di 21 giorni.

Il mangime utilizzato, di tipo commerciale, viene somministrato seguendo la curva high-low-high, che prevede 2,8-2,5-3,0 Kg rispettivamente all'inizio (fino ai 40 giorni), a metà (dai 40 agli 80 giorni) e a fine gestazione (dagli 80 fino al giorno precedente il parto). Durante la prima settimana di lattazione vengono erogati due pasti giornalieri e, a partire dall'ottavo giorno, si passa a tre somministrazioni, per un apporto medio giornaliero di circa 6,5 Kg capo.

La distribuzione dell'acqua è affidata ad un silos di raccolta, tributario di un pozzo artesiano che, attraverso un sistema di tubazioni, raggiunge gli animali tramite abbeveratoi a spillo, eccezion fatta per la gestazione in gabbia ove è presente un truogolo lungo in cui viene sempre garantito un livello minimo d'acqua.

L'azienda, dove viene applicata una riforma volontaria al 7° parto, si distingue per l'elevata produttività (vedi tabella 1). A partire dal mese di dicembre 2008 veniva osservato in sala parto un aumento della mortalità nei suinetti, i cui aspetti clinici verranno trattati nel capitolo relativo ai risultati.

Tabella 1: Riepilogo produttivo annuale

Table 1: annual production summing up

Presenza media di scrofe	533,29	Numero di svezzati/Parto	11,49
Numero fecondazioni	1478	(%) mortalità in lattazione	9,67
(%) messa al parto	85,86	Parti/Scrofa/Anno	2,37
Numero di nati tot/Parto	13,51	Svezzati/Scrofa/Anno	27,28
Numero di nati vivi/Parto	12,72	(%) rimonta	65,07
(%) mortalità alla nascita	5,84		

Necroscopia

Quattordici suinetti e una scrofa morta in sala parto, sono stati conferiti, entro poche ore dalla morte presso la sezione di Reggio Emilia, (IZSLER) e sottoposti a necroscopia seguendo una tecnica standardizzata.

Esame batteriologico

Il contenuto intestinale e diversi organi, (fegato, milza e reni) sono stati prelevati per l'esecuzione di esami microbiologici, impiegando tre diversi terreni colturali, l'Agar sangue, l'Agar Siero e l'Hektoen Enteric Agar, terreno selettivo differenziale per le enterobatteriacee. L'incubazione è stata eseguita a 37°C per 48 ore in aerobiosi.

Inoltre, per l'isolamento di *C. perfringens*, diluizioni in soluzione fisiologica in base dieci del contenuto del piccolo intestino (da 10⁻² fino a 10⁻⁸) sono state spatolate su piastre di Agar Sangue in ragione di 0,1 ml. Successivamente le piastre sono state incubate in anaerobiosi a 37°C per 48 ore. La presenza di *C. perfringens* è stata considerata significativa se superiore a 1x 10⁶ ufc/g.

Le colonie con caratteri morfologici tipici per *C. perfringens* sono state sottoposte a test di conferma tramite la prova CAMP *reverse* in anaerobiosi, seguendo una metodica standardizzata (Hansen M.V. and Elliot L.P., 1980).

Il contenuto del colon è stato inviato presso la Sezione di Mantova (IZSLER) sia per la ricerca di *Clostridium difficile* tramite metodica microbiologica, sia per rilevare la presenza delle tossine A e B prodotte da questo clostridio, attraverso l'impiego di un kit ELISA presente in commercio (*Clostridium difficile* tox A/B II kit, TechLab) (Nardi et al., 2005).

Genotipizzazione

I ceppi di *Clostridium perfringens* isolati sono stati sottoposti a genotipizzazione con metodica PCR multiplex in grado di rilevare, con un'unica prova, geni codificanti per le tossine α , β , ϵ , ι , $\beta 2$ e per l'enterotossina (Bueschel D.M. et al., 2000; Rosignoli et al., 2004). Il test è stato effettuato presso la Sezione di Mantova dell'IZSLER.

Esame citologico

I preparati citologici, allestiti tramite impronta di una sezione epatica, sono stati essiccati all'aria e colorati tramite l'impiego di una colorazione rapida presente in commercio (Diff Quick).

Esame istologico

Campioni di fegato, milza, rene, polmone, cuore, encefalo e porzioni di diversi tratti intestinali sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, tagliati al microtomo a 5 μ m di spessore e colorati con ematossilina-eosina secondo le metodiche in uso. Sezioni seriali dei tratti intestinali sono state inoltre colorate con la colorazione di Gram.

Esame tossicologico

In seguito alla valutazioni dei quadri anatomopatologici sono stati eseguiti prelievi di mangime gestazione per scrofe al fine di valutare la presenza di micotossine, in particolare sono state ricercate lo zearalenone, mediante metodica micro-LCMS, le aflatossine B1, B2, G1 e G2 e l'ocratossina A, mediante cromatografia liquida (HPLC) e le fumonisine B1 e B2 tramite cromatografia liquida spettrometrica di massa (LCMS/MS).

Interventi profilattici/terapeutici

In attesa dell'esito delle indagini descritte precedentemente, considerata la gravità della situazione sanitaria, si è intervenuti farmacologicamente con l'impiego di un protocollo

terapeutico ad ampio spettro, impiegando chinolonici somministrati per via parenterale ed associazioni di penicilline e polimixine per via orale. Successivamente all'inquadramento eziologico del problema sanitario si è invece intervenuti con l'impiego di Tilosina "long acting", somministrata per via parenterale impiegando la dose di 20 mg/kg di peso corporeo.

Analisi statistica

Le differenze osservate nel numero di soggetti deperiti e nel numero di soggetti con diarrea in lattazione rispetto ai nati totali tra i differenti mesi di produzione, sono state confrontate tramite test Chi² con livello di significatività p<0.01.

RISULTATI

Allevamento e rilievi clinici

A partire dal mese di dicembre nelle sale parto si è verificato un aumento della mortalità nei suinetti (tabella 2), i quali già nelle prime 24 ore dal parto, presentavano apatia ed ittero, si coricavano sotto la lampada in posizione antalgica e si avvicinavano al capezzolo con fatica. Nel nido era possibile riscontrare la presenza di feci diarroiche trasparenti e gelatinose alla palpazione. La morte sopraggiungeva nell'arco delle 12 ore successive alla comparsa dei sintomi. Durante questa prima fase la morbilità era attorno al 20%, mentre la mortalità raggiungeva valori prossimi al 100%.

Con il passare dei giorni, nei soggetti sopravvissuti, piuttosto che in alcune covate non ancora colpite, faceva la comparsa una diarrea emorragica, picea, dall'odore sgradevole e dalla consistenza collosa. Anche in questo caso la mortalità era molto elevata, mentre la morbilità si presentava attorno al 5%.

Nella tabella 2 sono riportati, in ordine cronologico, gli eventi relativi alla sala parto nel periodo che va da ottobre 2008 a marzo 2009.

Tabella 2: dati aziendali delle sale parto

Table 2: management data of farrowing room

Periodo parto	N parti	NT	Morti nelle 24h	Morti in lattaz.
Totale Ottob.	91	1205	40sc, 23sp, 24altro	42sc, 20de ^a , 2em, 0dr ^a
Totale Novem.	89	1134	36sc, 23sp, 30altro	25sc, 7de ^a , 3em, 0dr ^a
Totale Dicem.	103	1276	30sc, 43sp, 28altro	25sc, 89de ^b , 0em, 2dr ^a
Totale Gennaio	134	1795	67sc, 78sp, 19 altro	29sc, 26de ^a , 0em, 66dr ^b
Totale Febb.	97	1305	46sc, 64sp, 9altro	6sc, 13de ^a , 0em, 13dr ^c
Totale Marzo	92	1144	47sc, 20sp, 28altro	8sc, 14de ^a , 0em, 4dr ^a

Legenda:

NT: nati

Sc: schiacciati

Sp: sottopeso

De: deperiti

Dr: diarrea

Em: emorragia

^{a,b,c}= a lettera differente corrisponde differenza statisticamente significativa (test chi², p<0.01) del numero di De/Dr rispettivamente al numero di NT nei differenti mesi.

Necroscopia

L'esame necroscopico eseguito sulla scrofa deceduta ha evidenziato quadri di epatomegalia e diminuzione di consistenza del parenchima epatico che si presentava inoltre di colore giallastro. A livello di intestino tenue si sono rilevati quadri di enterite catarral-emorragica.

Nei suinetti sottoscrofa sono stati osservati quadri anatomo-patologici differenti da mettere in relazione al momento della morte dell'animale rispetto all'evoluzione del processo patologico in atto. I quadri anatomo-patologici osservati nei 6 suinetti conferiti e deceduti con le forme acute descritte in precedenza (morte entro 12 ore dalla comparsa dei sintomi) erano caratterizzati da epatomegalia e colorazione giallastra del parenchima epatico che presentava inoltre diminuzione della consistenza e piccole aree di necrosi di alcuni mm di diametro. In due soggetti era inoltre evidente la rottura del fegato con abbondante emoperitoneo.

Nei conferimenti successivi, costituiti complessivamente da 8 suinetti, coincidenti con una riduzione della mortalità e con la comparsa di una diarrea emorragica nei soggetti colpiti, erano evidenti quadri anatomo-patologici intestinali caratterizzati da edema mesenterico ed intensa iperemia della mucosa intestinale, soprattutto a livello di digiuno e ileo, ascrivibili ad enterite emorragica (foto 1). A livello degli altri organi ed apparati, sia della cavità addominale che toracica, non sono state evidenziate lesioni degne di nota, eccezion fatta per quadri di congestione polmonare in alcuni animali.

Esame batteriologico

L'esame batteriologico dal contenuto intestinale sia della scrofa sia dei suinetti ha permesso di isolare in anaerobiosi un batterio emolitico, Gram positivo, bastoncellare, identificato come *Clostridium perfringens*. La determinazione quantitativa del batterio è risultata essere altamente significativa (1×10^7 ufc/g nei suinetti, e 12×10^7 ufc/g nella scrofa).

Gli esami batteriologici eseguiti su fegato, rene e milza hanno sempre dato esito negativo. La ricerca di *Clostridium difficile* dal contenuto intestinale e delle relative tossine tramite test ELISA hanno dato in tutti i casi esiti non significativi.

Genotipizzazione

La successiva genotipizzazione tramite PCR ha identificato l'agente eziologico come portatore dei geni codificanti le tossine α e $\beta 2$.

Esame citologico

L'esame citologico su impronte di parenchima epatico evidenziava quadri degenerativi a carico degli epatociti.

Esame istologico

Istologicamente le lesioni più significative erano localizzate nei tratti intestinali che mostravano intenso edema dell'asse dei villi e della sottomucosa, vasi ectasici e coagulazione intravasale disseminata (foto 2). I villi erano iperemici, necrotici ed in alcuni tratti il materiale necrotico, costituito per la maggior parte da detriti cellulari, fibrina e granulociti neutrofili, si depositava sulla loro superficie formando delle pseudomembrane. Ammassi batterici Gram positivi con spore terminali erano frammisti al detrito cellulare. L'edema era presente anche nel linfonodo mesenterico associato ad ectasia dei vasi linfatici, deplezione linfocitaria, necrosi multifocali e microascessi nella

midollare. Il fegato mostrava degenerazione torbido-vacuolare degli epatociti, necrobiosi e stasi biliare. Nel rene i tubuli uriniferi erano ectasici con epitelio di rivestimento appiattito e nel lume erano presenti ammassi di cellule desquamate, detriti necrotici e più raramente cellule infiammatorie. Nell'encefalo, cuore, polmone e nella milza non si apprezzavano reperti di rilievo.

Esame tossicologico

Gli esami tossicologici eseguiti sul mangime per la ricerca delle micotossine (zearalenone, aflatossine B1, B2, G1 e G2, fumonisine B1 e B2 e ocratossina A) hanno evidenziato valori compresi nei limiti disposti dalle norme legislative.

Interventi profilattici e terapeutici

Gli interventi farmacologici messi in atto alla comparsa dei sintomi hanno sempre sortito risultati decisamente scadenti. In concomitanza all'isolamento di *Clostridium perfringens* ci si è orientati verso una strategia terapeutica caratterizzata dall'impiego di un'associazione parenterale sulfamidici-macrolidi, somministrati, per l'appunto, prima della comparsa dei sintomi a tutti i suinetti. Da questo punto in avanti si sono cominciati ad apprezzare i primi risultati. Infine, grazie ad un macrolide "long acting", sempre somministrato per via parenterale e rigorosamente entro le prime 12 ore di vita, si è assistito ad un completo controllo dell'insorgenza dei sintomi, come evidenziato nei mesi di febbraio e marzo.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La sintomatologia evidenziata è stata caratterizzata da diverse fasi. In un primo momento si è assistito a morte improvvisa dei suinetti entro poche ore dalla nascita e con presenza di lesioni anatomopatologiche scarsamente significative all'esame necroscopico. Successivamente vi è stata una riduzione della mortalità e nei sopravvissuti compariva una sintomatologia più evidente, caratterizzata da diarrea necrotico-emorragica. L'esame necroscopico ha evidenziato quadri di enterite emorragica al piccolo intestino compatibile con un'infezione da *C. perfringens*.

A conferma del quadro clinico ed anatomo-patologico, l'esame microbiologico ha evidenziato la presenza di un numero significativamente elevato di *Clostridium perfringens* tipo A + β_2 a livello intestinale e l'esame istologico ha rilevato quadri altamente significativi e compatibili con una diagnosi di enterotossiemia da clostridi.

Le indagini in PCR spese a verificare la presenza di eventuali altri agenti eziologici, come il virus della malattia di Aujeszky e l'encefalomiocardiovirus (EMCV), le indagini parassitologiche (che per semplicità non sono state riportate per esteso nel lavoro), così come gli esami tossicologici per la ricerca di micotossine, hanno dato tutte esito negativo.

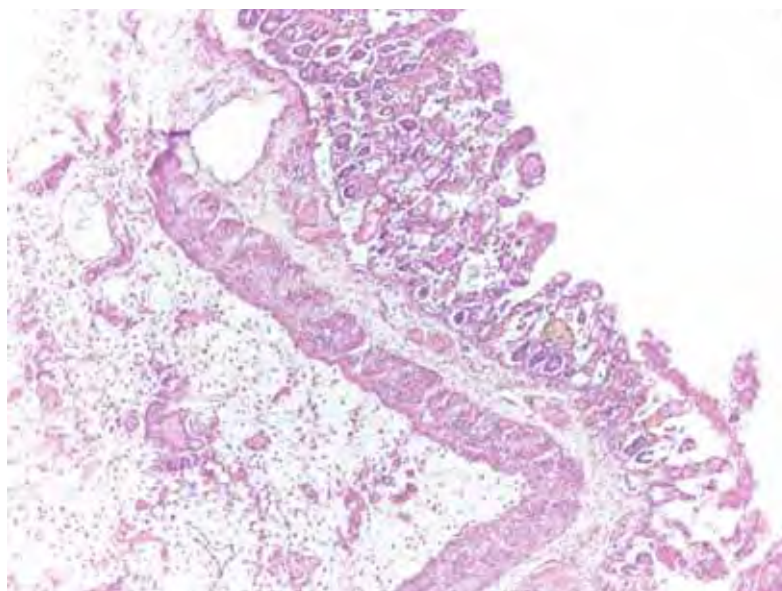
La terapia messa in atto a scopo preventivo tramite somministrazione parenterale di un antibiotico specificatamente attivo nei confronti dei clostridi ha dato ottimi risultati.

Alla luce dei fatti qui riportati si può concludere che l'allevamento in questione, con buone probabilità, è stato interessato da una forma clinica ascrivibile ad enterotossiemia da *Clostridium perfringens* tipo A + β_2 che si è completamente risolta grazie ad un trattamento antibiotico preventivo mirato, al mantenimento di elevati standard igienici nelle sale parto e all'applicazione di pratiche in grado di favorire un buon trasferimento dell'immunità materna nel suinetto lattante.

FOTO 1: Suinetto di 2 giorni d'età. Quadri anatomopatologici compatibili con degenerazione epatica ed enterite emorragica con prevalente localizzazione al piccolo intestino.
FIGURE 1: Two days old piglet. Liver degeneration and haemorrhagic small intestine.



FOTO 2: Piccolo intestino. Intenso edema a livello della sottomucosa, lamina propria e villi, congestione dei vasi ematici e necrosi dei villi (20x, ematossilina-eosina)
FIGURE 2: Small intestine. Necrosis of the mucosa, blood vessels congestion and edema localized in the submucosa and villus.



BIBLIOGRAFIA

1. Bryant A.E., Bayer C.R., Aldape M.J., Wallace R.J., Titball R.W. and Stevens D.L. (2006). “*Clostridium perfringens* phospholipase C-induced platelet/leukocyte interactions impede neutrophil diapedesis”. *J. of Med. Microbiol.* 55: 495-504.
2. Bueschel D.M., Songer J.G., Garmory H.S., Chanter N., French N.P., and Titball R.W. (2000). “Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assay”. *Epidemiol. Infect.* 124: 61-67.
3. Hansen M.V. and Elliot L.P. (1980). “New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test”. *J. of Clinical Microbiology*, 617-619.
4. Le Guennec J., Moalic P.Y., Salle E., and Manteca C. (2003). “Are clostridia a major etiology of diarrhoea in piglets?” In: *Clostridial Enterotoxaemia and Enteritis in Farm Animals*, pp. 61-62.
5. Nardi M., Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A. (2005). “Il *Clostridium difficile* nelle enteriti neonatali del suinetto: indagine in allevamenti della pianura padana”. *Atti XXXI Meeting annuale Sipas*, pp. 531-538.
6. Nardi M., Faccini S., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A.D. (2005). “Il *Costridium difficile* nelle enteriti neonatali del suinetto: indagine in allevamenti della Pianura Padana”. *Atti del Congresso della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei suini – Mantova* – pp. 531-538.
7. Nigrelli A.D. (2009). “Enteriti neonatali enzootiche dei suinetti lattanti, con particolare riguardo alle clostridiosi”. *Atti XXXV Meeting annuale Sipas*, pp. 134-141.
8. Okazaki Y., Inage M., Iwabuchi I., Suzuki T., Okada N., Watanabe K. and Yamamoto T. (1993). “Mass outbreak of necrotic enteritis in newborn piglets caused by *Clostridium perfringens* type C on a pig farm”. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 46: 214-217.
9. Rosignoli C., Faccini S., Franzini G., Costa A., Nardi M., Nigrelli A.D. (2004). “Rilevamento in ceppi di *Clostridium perfringens* dei geni codificanti per le tossine letali maggiori, la tossina beta 2 e l’enterotossina mediante multiplex PCR”. *VI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. – Abano Terme 10-12 Novembre 2004*, pp 205-206.
10. Sanz M.G., Venturini L., Assis R., Uzal F.A. (2005). “Fibrinonecrotic enteritis of piglets in a commercial farm. A post-mortem study of the prevalence and the role of lesion associated agents *Isoospora suis* and *Clostridium perfringens*”. *J. Vet. Med. Sci.*
11. Songer J.G. (1996). “Clostridial enteric disease of domestic animals”. *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 216-234.
12. Songer J.G., Glock R.D., Post K.W., (2004): *Clostridial diarrheal diseases: neonatal infections that affect postweaning performance*. *American Ass. Swine Veterin.*, pp. 491-494
13. Songer J.G. and Uzal F.A. (2005). “Clostridial enteric infections in pigs”. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 528-536.
14. Tayler D.J. (2003). “Clostridia and clinical disease in pigs”. In *Clostridial Enterotoxaemia and Enteritis in Farm Animals*, pp. 51-60.
15. Taylor D.J. et Bergeland M.E. (1996). “Infezioni da clostridiosi”. *Malattie del suino* pp. 547-564.