

STUDIO SULL'ANTIBIOTICO SENSIBILITA' DI BATTERI PATOGENI ISOLATI DA CANARINI E PAPPAGALLI

Leone S., Bottinelli M., Alessandri G., Fiorini P., Di Schiavi M., Vesentini G., Merenda M., Catania S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 Laboratorio di diagnostica clinica e sierologia di piano, via Bovolino, 1/C, 37060 Buttapietra (VR) Italia

Summary

Antimicrobial resistance is a threat to human and animal health. Measures aimed at its containment include reducing the use of antibiotics and choosing them conscientiously. Making use of laboratory techniques such as measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) enables the formulation of appropriate and effective therapy, consequently reducing the risk of developing antibiotic resistance. The aim of this study was to evaluate the antibiotic sensitivity of pathogenic bacteria isolated from canaries and parrots during 2017-2021. The results show that high percentages of strains of the bacterial species tested are sensitive to the tested antimicrobials, highlighting the lack of need to switch to alternative or critical antibiotics.

INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza è una delle problematiche di maggior impatto per la salute pubblica. L'utilizzo imprudente o errato di antibiotici porta alla selezione di popolazioni batteriche resistenti o multiresistenti, particolarmente difficili da debellare in caso di infezione. Difatti il Regolamento UE 429 del 2016 in tema di malattie animali trasmissibili fa esplicito riferimento all'antimicrobico resistenza come minaccia alla salute umana e animale sottolineando l'importanza di tutte le misure volte contenerla come, ad esempio, la riduzione dell'utilizzo di antibiotici. Nell'ottica One Health, l'uso dell'antibiotico, nel settore zootecnico ed anche in quello degli animali da compagnia, è **stato** gradualmente ridotto nel tempo a favore di un utilizzo più consapevole e basato su dati oggettivi ottenuti in laboratorio. A questo proposito, la possibilità di avvalersi di tecniche laboratoristiche come la misurazione della concentrazione minima inibente (MIC) consente ai liberi professionisti la formulazione di una terapia appropriata ed efficace, riducendo conseguentemente il rischio di sviluppo di antibiotico resistenza. Da diversi anni presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, l'analisi della MIC si è rivelata un valido strumento per valutare la sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici coinvolti negli eventi morbosi delle differenti specie animali. Considerato che gli uccelli ornamentali rappresentano la quarta categoria *pet* maggiormente diffusa in Italia dopo cani, gatti e pesci¹, abbiamo deciso di valutare l'antibiotico sensibilità di batteri patogeni isolati da canarini e pappagalli durante il periodo 2017-2021.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I ceppi batterici inclusi nello studio sono stati isolati dal marzo 2017 al febbraio 2021, durante la normale attività diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe).

Tali ceppi derivavano dai seguenti campioni:

- Tamponi cloacali o da altri distretti anatomici effettuati su canarini (*Serinus canaria*) e pappagalli (diverse specie appartenenti all'ordine degli Psittaciformi), conferiti presso l'IZSVe con richiesta di esame batteriologico.
- Uova o organi di canarini e di pappagalli sottoposti a necropsia diagnostica presso l'IZSVe.

La determinazione della MIC è stata eseguita soltanto per le specie batteriche isolate aventi significato clinico/patologico, tenendo conto dell'anamnesi dei singoli soggetti e degli eventuali reperti anatomopatologici riscontrati.

I germi oggetto di studio sono risultati pertanto:

- *Escherichia coli* (*E.coli*);
- *Klebsiella* spp.;
- batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* diversi da *E.coli*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp.;
- *Staphylococcus* spp. Coagulasi negativi;
- *Staphylococcus* spp. Coagulasi positivi.

Il gruppo studio è risultato quindi composto da:

- 220 ceppi di *E.coli* di cui 143 isolati da canarino e 77 ceppi isolati da pappagallo;
- 34 ceppi di *Klebsiella* spp. isolati da canarino;
- 48 ceppi di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati da canarino;
- 119 ceppi di *Staphylococcus* spp. Coagulasi negativi di cui 67 isolati da canarino e 52 isolati da pappagallo;
- 35 ceppi di *Staphylococcus* spp. Coagulasi positivi isolati da canarino.

Isolamento e identificazione dei batteri

I tamponi sono stati seminati in maniera diretta su piastre di Blood Agar (Agar base, Biolife Italiana, Milano, Italia), sangue ovino (allevamento Blood, Castellalto, Italia), MacConkey's Agar (Biolife Italiana, Milano, Italia) e Bile-Esculine Agar (Biolife italiana, Milano, Italia). Le piastre sono state incubate a 37 ± 1 °C in condizioni di aerobiosi e di microaerofilia (atmosfera al 5% di CO₂). Ogni tampone è stato successivamente posto all'interno di una provetta contenente brodo di arricchimento (Heart Infusion Broth) (Biolife italiana, Milano, Italia).

In sede autoptica, aliquote degli organi di canarini e di pappagalli presentanti lesioni macroscopiche sono state campionate in maniera asettica e seminate come precedentemente descritto; allo stesso modo un'aliquota di tessuto è stata inoculata in una provetta contenente brodo di arricchimento.

Le piastre sono state controllate dopo 24 ore d'incubazione per verificare l'avvenuta crescita batterica. In caso di crescita, si è proceduto all'identificazione delle specie batteriche; in caso contrario le piastre di primo isolamento sono state reincubate per ulteriori 24 ore e 10 µl di brodo di arricchimento sono stati seminati seguendo le medesime procedure già descritte.

L'identificazione batterica è avvenuta attraverso la morfologia delle colonie in piastra, test ossidasi e catalasi, prove biochimiche in macrometodo e osservazione al microscopio ottico della morfologia cellulare previa colorazione di Gram.

Determinazione della MIC

La procedura di determinazione della MIC è stata eseguita con metodo di microdiluzione in brodo utilizzando micropiastre commerciali a 96 pozzetti preallestite con diverse concentra-

zioni di principi attivi in forma liofilizzata (Merlin Diagnostika, Bornheim, Germania). Le colonie batteriche in esame sono state prelevate da piastra Blood Agar e poste in brodo Mueller Hinton II (Cation-Adjusted) (Becton Dickinson Italia, Milano, Italia). All'interno dei pozzetti è stato inoculato brodo contenente tra 1 e 9×10^5 UFC/ml. Le piastre sono state incubate in aerobiosi a $34^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e la crescita batterica nei pozzetti è stata valutata dopo 16-20 ore di incubazione. Il valore di MIC di ciascun antimicrobico testato è stato corrispondente alla più bassa concentrazione di principio attivo per la quale non si è osservata crescita nel pozzetto. In particolare, sono stati valutati i valori di MIC per gli antibiotici in tabella 1 per i germi Gram-negativi allo studio e gli antibiotici in tabella 2 per quelli Gram-positivi. Sono stati valutati inoltre i valori MIC di antibiotici CIA (*Critically Important Antimicrobials*) presenti in tabella 3 per i Gram-negativi e tabella 4 per i Gram-positivi. Per l'espressione dei risultati si è fatto riferimento a *breakpoint* definiti per ognuno degli antibiotici in esame ed elencati nelle tabelle 1, 2, 3 e 4, espressi in $\mu\text{g/ml}$.

Antibiotico	<i>Breakpoint</i> per “sensibile”	<i>Breakpoint</i> per “resistente”	Fonte <i>breakpoint</i>
Aminosidina	8	32	SFM (per Kanamicina)
Ampicillina	8	32	CLSI-H
Florfenicolo	8	32	CLSI-V (per <i>S.cholerae</i>)
Tetraciclina	4	16	CLSI-H
Gentamicina	4	16	CLSI-H
Apramicina	16	32	BAKUM
Trimethoprim/ Sulfamethoxazolo	2	4	CLSI-H

Tabella 1: Antibiotici testati per batteri Gram-negativi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state la Società Francese di Microbiologia (SFM), il Clinical and Laboratory Standards Institute per microrganismi isolati nell'uomo (CLSI-H) o da animali (CLSI-V), il Laboratorio Diagnostico Veterinario di Bakum dell'Università di Hannover (BAKUM). Eventuali note sono presenti tra parentesi al lato della sigla.

Antibiotico	<i>Breakpoint</i> per “sensibile”	<i>Breakpoint</i> per “resistente”	Fonte <i>breakpoint</i>
Ampicillina	0,25	1	CLSI-V (altre specie)
Tiamulina	2	4	EUCAST (ECOFF per <i>Staph. aureus</i>)
Doxiciclina	4	16	CLSI-H M100 (2014)
Penicillina G	0,125	0,25	CLSI-V (derivato umana)
Lincomicina	2	8	SFM

Tabella 2: Antibiotici testati per batteri Gram-positivi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state il Clinical and Laboratory Standards Institute per microrganismi isolati nell'uomo presenti nel manuale M100 del 2014 (CLSI-H M100) e per microrganismi isolati da animali (CLSI-V), l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EU-

CAST) in riferimento a cut-off epidemiologici (ECOFF), la Società Francese di Microbiologia (SFM). Eventuali note sono presenti tra parentesi al lato della sigla.

Antibiotico	Breakpoint per “sensibile”	Breakpoint per “resistente”	Fonte breakpoint
Colistina	2	4	EUCAST, SFM
Enrofloxacin	0,25	2	CLSI-V
Flumequin	4	8	SFM

Tabella 3: Antibiotici CIA testati per batteri Gram-negativi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state l’European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), la Società Francese di Microbiologia (SFM), il Clinical and Laboratory Standards Institute per microrganismi isolati da animali (CLSI-V).

Antibiotico	Breakpoint per “sensibile”	Breakpoint per “resistente”	Fonte breakpoint
Tilmicosina	8	32	Y.WANG et al., 2008 ²
Tilosina	4	32	USDA

Tabella 4: Antibiotici CIA testati per batteri Gram-positivi e valori di breakpoint. Le fonti dei breakpoint sono state l’articolo di Y.Wang et al. del 2008 “Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis” e l’U.S. Department of Agriculture (USDA).

La definizione di “sensibile” è stata attribuita ai ceppi batterici il cui valore di MIC, espresso in µg/ml, era inferiore o uguale al *breakpoint* di sensibilità definito per la combinazione batterio-antibiotico-specie animale.

RISULTATI

Nella tabella 5 è riportata la percentuale di ceppi batterici Gram-negativi allo studio risultata sensibile alle diverse molecole antibiotiche oggetto di studio, in base ai *breakpoint* definiti. In tabella 6 si trovano i medesimi dati relativi ai batteri Gram-positivi.

Antibiotico	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	Enterobatteriacee (non <i>E.coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i>)
Aminosidina	92,73%	82,35%	95,83%
Ampicillina	62,27%	5,88%	37,50%
Florfenicolo	90,00%	61,76%	41,67%
Tetraciclina	75,00%	76,47%	81,25%
Gentamicina	95,91%	91,18%	93,75%
Apramicina	98,18%	94,12%	95,83%
Trimethoprim/ Sulfamethoxazolo	83,56%	82,35%	81,25%

Tabella 5: percentuale di ceppi batterici Gram-negativi sensibili per antibiotico in base ai breakpoint definiti.

Antibiotico	<i>Staphylococcus spp.</i> Coagulasi-negativo	<i>Staphylococcus spp.</i> Coagulasi-positivo
Ampicillina	76,47%	79,41%
Tiamulina	59,32%	94,29%
Doxiciclina	77,12%	65,71%
Penicillina G	67,23%	77,14%
Lincomicina	44,07%	14,29%

Tabella 6: percentuale di ceppi batterici Gram-positivi sensibili per antibiotico in base ai breakpoint definiti.

Per quanto riguarda i CIA, per i germi Gram-negativi sono stati testati gli antibiotici colistina, enrofloxacin e flumequina.

Tali sostanze, nella categorizzazione degli antibiotici destinati all'impiego negli animali stilata dall'EMA (*European Medicines Agency*)³, sono all'interno della categoria B ossia quella degli antibiotici da limitare in quanto importanti in medicina umana. Questi antibiotici dovrebbero essere utilizzati solo quando non ci sono antibiotici efficaci di altre categorie e dopo aver eseguito test di sensibilità. I risultati ottenuti sono visibili in tabella 7.

Antibiotico	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	Enterobatteriacee (non <i>E.coli</i>, <i>Klebsiella spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i>)
Colistina	95,45%	82,35%	83,33%
Enrofloxacin	85,00%	76,47%	83,33%
Flumequina	86,36%	76,47%	83,33%

Tabella 7: percentuale di ceppi batterici Gram-negativi sensibili per antibiotico CIA in base ai breakpoint definiti.

Per i batteri Gram-positivi in studio, i CIA testati sono la tilosina e la tilmicosina.

Queste sostanze sono inserite nella categoria C della classificazione stilata dall'EMA e sono quindi antibiotici da utilizzare con attenzione, in quanto sono presenti delle alternative in medicina umana. Vengono utilizzati quando non ci sono antibiotici della categoria D disponibili o clinicamente efficaci. Gli antibiotici di categoria D sono antibiotici che devono essere utilizzati con prudenza e devono essere il trattamento di prima linea. I risultati ottenuti si trovano in tabella 8.

Antibiotico	<i>Staphylococcus spp.</i> coagulasi-negativo	<i>Staphylococcus spp.</i> coagulasi-positivo
Tilmicosina	75,42%	17,14%
Tilosina	72,03%	14,29%

Tabella 8: percentuale di ceppi batterici Gram-positivi sensibili per antibiotico CIA in base ai breakpoint definiti.

DISCUSSIONE

Canarini e pappagalli posseggono un microbiota intestinale principalmente costituito da batteri Gram-positivi⁴. Stress, alimentazione inadeguata, utilizzo di antimicrobici, patologie concomitanti, possono provocare uno squilibrio tra le popolazioni batteriche normalmente presenti a livello intestinale con una conseguente sovracrescita di batteri Gram-negativi^{5,6}. Alcune tra le specie più comunemente riscontrate in questi casi sono *E.coli*, *Klebsiella* spp. ed *Enterobacter* spp.⁷. Questi germi possono essere responsabili di enteriti, ma possono invadere anche altri distretti anatomici provocando sintomatologia respiratoria e/o nervosa o setticemia^{6,8}.

Per i batteri Gram-positivi, la specie in esame è stata *Staphylococcus* spp., un batterio commensale, oltre che ubiquitario nell'ambiente. Questo viene riscontrato spesso in caso di infertilità delle uova⁹, di artrite e/o sinovite e di dermatite⁸.

Inoltre, durante il periodo delle cove, *Staphylococcus* spp., *E.coli*, *Klebsiella* spp. e i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* vengono comunemente rilevati in corso di fenomeni morbosi caratterizzati da mortalità embrionale, neonatale o dei pullus e possono contribuire a provocare importanti perdite numeriche nell'allevamento dei *pet birds*⁹.

L'allevamento degli uccelli da compagnia in Italia è stato, in passato, piuttosto distante dalla medicina veterinaria; basti pensare che solo 20 anni fa i medici veterinari che nel territorio nazionale si occupavano della gestione sanitaria di tale tipologia di allevamento erano, al massimo, una decina. Ciò, nella scelta degli interventi terapeutici, ha eventualmente potuto favorire l'utilizzo del c.d. "fai date te" oppure del passaparola tra allevatori e rivenditori di uccelli, talvolta anche per quanto riguardava l'utilizzo dell'antibiotico.

Si può ipotizzare che la gestione sanitaria di questo tipo di allevamenti sia migliorata grazie alla maggior presenza di professionisti specializzati nel settore, alla formazione effettuata sul campo ed alla maggiore fruibilità di metodi diagnostici di laboratorio anche per tali tipologie di animali. Infine, da non dimenticare la maggiore consapevolezza ed attenzione alle problematiche sanitarie delle nuove generazioni di allevatori che quindi correttamente si affidano a professionisti per la gestione sanitaria dei gruppi.

I risultati del nostro studio mettono in evidenza che alte percentuali di ceppi delle specie batteriche testate sono sensibili ad antimicrobici non-CIA, sottolineando che nel settore dei *pet birds* esistono ancora ottimi margini di manovra terapeutici, anche di primo intervento, e la mancata necessità di passare ad antibiotici alternativi o critici.

Rimane comunque da evidenziare che gli stafilococchi Coagulasi-positivi sono risultati la specie batterica meno sensibile tra quelle testate, con basse percentuali di ceppi batterici sensibili agli antibiotici CIA allo studio. Tale dato risulta particolarmente importante, oltre che dal punto di vista terapeutico, anche dal punto di vista della salute umana, in quanto gli uccelli da compagnia possono trasmettere batteri ai loro detentori o diffonderli nell'ambiente rappresentando un potenziale pericolo zoonotico¹⁰.

CONCLUSIONI

L'utilizzo prudente e coscienzioso degli antimicrobici, basato su dati oggettivi come i test di antimicrobico-sensibilità, risulta attualmente la nostra principale arma nei confronti dell'antibiotico resistenza. I dati ottenuti devono essere considerati uno stimolo al continuo miglioramento dell'approccio terapeutico in corso di eventi morbosi e sottolineano l'importanza del controllo sanitario attraverso la diagnosi laboratoristica e il dato della MIC. La raccolta e la divulgazione di questi dati (come avviene ad esempio per l'IZSVE attraverso la sua pagina web <https://www.izsvenezie.it/antibiotico-sensibilita-report-mic/>) può essere di ausilio

al Medico Veterinario nelle scelte di primo intervento, oltre a supportarlo nella formazione degli altri professionisti del settore sul tema dell'antibiotico sensibilità e sui risvolti ben più importanti dell'antibiotico resistenza. Ulteriori studi saranno necessari per comprendere la diffusione di batteri antibiotico resistenti nei volatili *pet* e per approfondirne le caratteristiche anche da un punto di vista genetico.

BIBLIOGRAFIA

1. Eurispes. *Rapporto Italia 2022*. <https://eurispes.eu/ricerca-rapporto/rapporto-italia-2022/>. Consultato il 31 luglio 2022.
2. Wang, Y., Wu, C. M., Lu, L. M., Ren, G. W., Cao, X. Y., Shen, J. Z. (2008). Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary microbiology*, 130(1-2), 118–125.
3. The European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-animal-health/>. Consultato il 31 luglio 2022.
4. Xenoulis, P. G., Gray, P. L., Brightsmith, D., Palculict, B., Hoppes, S., Steiner, J. M., Tizard, I., Suchodolski, J. S. (2010). Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Veterinary microbiology*, 146(3-4), 320–325.
5. Jones, D. M., and Nisbet, D. J. (1980). The gram negative bacterial flora of the avian gut. *Avian Pathology*, 9:1, 33-38.
6. Doneley R. J. (2009). Bacterial and parasitic diseases of parrots. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, 12(3).
7. Davies, Y. M.; Franco, L. S.; Barbosa, F. B.; Vanin, C. L.; Gomes, V. T. M.; Moreno, L. Z.; Barbosa, M. R. F.; Sato, M. I. Z.; Moreno, A. M.; Knöbl, T. (2022). Use of MALDI-TOF for identification and surveillance of gram-negative bacteria in captive wild psittacines. *Brazilian Journal of Biology*, 82, 233523.
8. Fudge, A. M. (2001). Diagnosis and treatment of avian bacterial disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(1), 3–11.
9. Catania S., Bilato D., Capitanio M., Barina M., Sturaro A., Iob L. (2009). Il controllo precova: come strumento per il miglioramento dei risultati riproduttivi nell'allevamento del canarino. *62° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini*. Pag. 9.
10. Ahmed, H. A., Awad, N., Abd El-Hamid, M. I., Shaker, A., Mohamed, R. E., Elsohaby, I. (2021). Pet birds as potential reservoirs of virulent and antibiotic resistant zoonotic bacteria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 75, 101606.