



150 Years  
Science For A Better Life



# SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

## Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2013



## LII Convegno Annuale

Forlì, 11-12 Aprile 2013

ATTI del LII Convegno Annuale

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE

In copertina: **“Gina la gallina”**, Nicoletta Belletti

[www.bellettinicoletta.it](http://www.bellettinicoletta.it)

**SOCIETÀ ITALIANA  
DI  
PATOLOGIA AVIARE**

SEZIONE ITALIANA DELLA  
WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION

**ATTI  
della Società Italiana  
di  
Patologia Aviare  
2013**

**Forlì  
11-12 Aprile 2013**





## INDICE

Prefazione ..... pag. 19

### ATTI DEL LI CONVEGNO ANNUALE *Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 Ottobre 2012*

#### INCONTRO

##### *“Stato sanitario dell’avicoltura italiana: focus sulle principali malattie osservate durante il 2012”*

- *Luigi Gavazzi e Emilio Morandini* - STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE ..... pag. 25
- *Diego Da Ros* - STATO SANITARIO DEL TACCHINO DA CARNE ..... pag. 35
- *Calogero Terregino* - EPIDEMIA DA H5N2 LPAI 2012 ..... pag. 45
- *Antonio Camarda, Ludovico Di Pineto* - STATO SANITARIO DELLA GALLINA OVAIOLA IN ITALIA ..... pag. 49

#### CONVEGNO

##### *“Uso responsabile degli antimicrobici in avicoltura”*

- *Dik Mevius* - ANTIMICROBIAL USE IN POULTRY AND CONSEQUENCES FOR HUMAN HEALTH ..... pag. 60
- *Roberto Villa* - TERAPIA IN “CONTINUO” O “PULSATA”: EFFETTI SULLA FARMACODINAMICA E FARMACOCINETICA DEGLI ANTIBIOTICI .. pag. 71
- *Petra Cagnardi* - TERAPIA IN CONTINUO O PULSATA: APPROCCIO PK/PD NELLA SOMMINISTRAZIONE ORALE DI FLUOROCHINOLONI NEL TACCHINO ..... pag. 79
- *Clara Montesissa* - APPROCCI LEGISLATIVI PER LA TUTELA DELL’AMBIENTE ..... pag. 85
- *Magda Ardizio e Carlo Castellina* - PROBLEMATICHE TERAPEUTICHE.. pag. 95
- *Alessandra Perrella* - FARMACOSORVEGLIANZA IN AVICOLTURA. IL PUNTO DI VISTA DEL MINISTERO DELLASALUTE ..... pag. 103

## ATTI DEL LII CONVEGNO ANNUALE

Forlì, 11-12 Aprile 2013

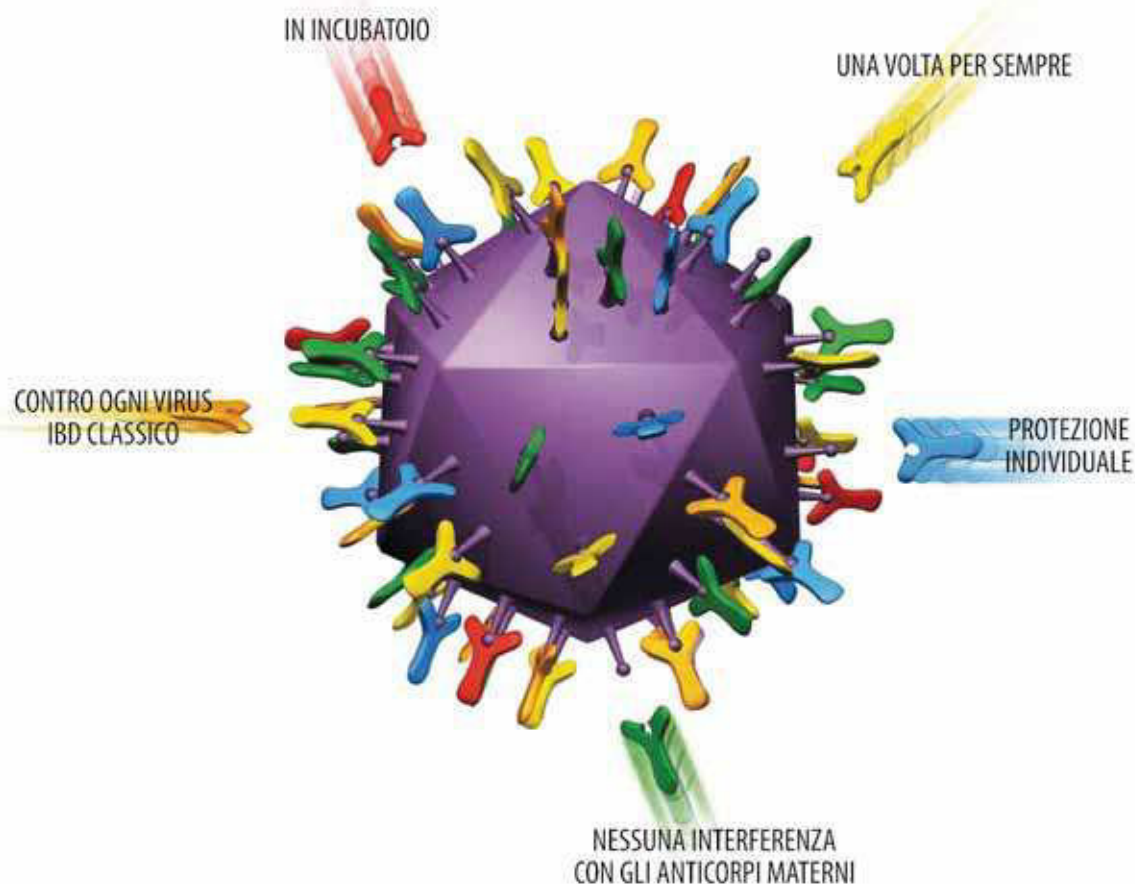
### COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- *Bano L., Giovanardi D., Bacchin C., Ferro T., Drigo I., Agnoletti F.*  
FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI CLINICI DI *C. PERFRINGENS* ISOLATI DA BROILER, TACCHINI DA CARNE E GALLINE OVAIOLE ..... pag. 115
- *Bano L., Trevisiol K., Tonon E., Ferro T., Furlan G., Drigo I., Agnoletti F.*  
INFLUENZA DELLA COLONIZZAZIONE INTESTINALE DA *BRACHYSPIRA* SPP. SULLO STATO SANITARIO E SULLE PERFORMANCE PRODUTTIVE DI OVAIOLE COMMERCIALI ..... pag. 120
- *Bano L., De Zan G., Viel L., Drigo I., Fracas V., Vascellari M., Agnoletti F.*  
EPISODI DI MENINGITE DA *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* NEL POLLO DA CARNE: ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI ..... pag. 126
- *Bano L., Pascoletti S., De Zan G., Cesca A., Moret C., Fagioni M., Agnoletti F., Drigo I.*  
APPLICAZIONE DELLA PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) PER LA CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS CECORUM* ISOLATI IN CORSO DI SPONDILITE VERTEBRALE DEL BROILER ..... pag. 130
- *Bonci M., Giovanardi D., Pesente P., Morandini E., Lupini C., Cecchinato M., Rossi G., Catelli E.*  
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BURSAITE INFETTIVA ISOLATI RECENTEMENTE IN ITALIA ..... pag. 136
- *Borrelli L., Fioretti A., Russo T.P., Gargiulo A., Caputo V., Rosato G., Pepe P., Rinaldi L., Dipineto L.*  
SYNANTHROPIC BIRDS AND PARASITES (POSTER) ..... pag. 142
- *Catania S., Rodio S., Baldasso E., Gerchman I., Mikula I., Levisohn S., Lysnyansky I.*  
CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DELL'ACQUISIZIONE DI RESISTENZA NEI CONFRONTI DI ENROFLOXACINA IN CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ..... pag. 145
- *Circella E., Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Bozzo G., Romito D., Camarda A.*  
INFEZIONE DA *POLYOMAVIRUS* IN NIDIACEI DI DIAMANTE DI GOULD (*ERITHRURA GOULDIAE*) (POSTER) ..... pag. 151
- *Dotto G., Giacomelli M., Giovanardi D., Franciosini M., Grilli G., Piccirillo A.*  
ANTIBIOTICO-RESISTENZA E INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE COMMERCIALI ..... pag. 156

- *Drigo I., Pascoletti S., Gobbo F., Catania S., Moret C., Agnoletti F., Bano L.*  
 IMPIEGO DEL MALDI-TOF PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE  
 BATTERICHE CLINICAMENTE RILEVANTI PER IL POLLAME ..... **pag. 165**
  
- *Franciosini M.P., Casagrande-Proietti P., Tacconi G., Grilli G., Piccirillo A.*  
 MIELOIDE IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI DI BROILER ..... **pag. 171**
  
- *Giacomelli M., Maschio M., Piccirillo A.*  
 INDAGINE SULLA COLONIZZAZIONE DA *CAMPYLOBACTER*  
 TERMOFILY IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE: RISULTATI  
 PRELIMINARI ..... **pag. 176**
  
- *Giacomelli S., Gallazzi D., Grilli G., Pozzi M., Scebba S., Soprano M., Vas Z.*  
 NUOVE SPECIE DI MALLOFAGI (*INSECTA: PHTHIRAPTERA*) PER  
 L'AVIFAUNA ITALIANA. **(POSTER)** ..... **pag. 182**
  
- *Lozito P., Fontana M.C., Merialdi G., Meliota F.*  
 EFFETTI DELLA VACCINAZIONE CON BIO-VAC SGP695 IN GALLINE  
 OVAIOLE INFETTATE SPERIMENTALMENTE CON *S. ENTERICA*  
 SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR *ENTERITIDIS* **(POSTER)** ..... **pag. 184**
  
- *Stella S., Martino P.A., Tosi G., Massi P., Tirloni E., Cossettini C.*  
 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FITOCSC® NEI CONFRONTI DI CEPPI  
 DI *E. COLI* E *SALMONELLA* SPP. ANTIBIOTICO-RESISTENTI ISOLATI DAL  
 POLLAME **(POSTER)** ..... **pag. 193**
  
- INDICE DEGLI AUTORI** ..... **pag. 199**



# Vaccine technology makes life simpler



Il tuo partner  
in terapia veterinaria  
e nutrizione animale



Terapia  
Veterinaria



Nutrizione  
Animale



Linea  
Disinfettanti

Distributore esclusivo per l'Italia:



Visita il NUOVO sito web!

[www.chemifarma.it](http://www.chemifarma.it)





# Metti insieme il quadro completo

Resa superiore

Migliore uniformità

Costo per kg competitivo

Investimenti in  
GB & UE

Strutture  
pedigree  
europee

Servizio  
tecnico a livello  
mondiale

[cobb-vantress.com](http://cobb-vantress.com)

Prestazioni dei  
riproduttori  
superiori

Schiusa  
migliore fino  
al 4%



Servire i nostri clienti attraverso l'uso di ricerche e tecnologie innovative per rendere la carne salubre ed economica per tutti



# L'azienda italiana che vola nel mondo.



Da sempre conoscenza, applicazione e innovazione rappresentano i segni distintivi di Dox-al e stanno alla base di tutti i suoi brevetti e tecnologie riconosciute a livello internazionale.

Forti di questa filosofia vincente, ogni giorno creiamo e sviluppiamo nuovi prodotti, tecnologie e servizi adatti ad ogni singola esigenza produttiva.

Una "soluzione su misura" per noi della Dox-al non è un semplice slogan pubblicitario ma, da sempre, lo scopo principale della nostra esistenza... da quarant'anni!



**Dox-al Italia S.p.A.**

Via Mascagni, 6 - 20884 Sulbiate (MB) Italy - Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400

dox-al

doxal.com



# Tifosi Aviare

da FATRO la prevenzione



in ACQUA di  
BEVANDA

CHIEDI INFORMAZIONI AL TUO VETERINARIO



la salute animale per la salute dell'uomo

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano Emilia (BO) - Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512714 - www.fatro.it - e-mail: info@fatro.it





[www.hipra.com](http://www.hipra.com)

---

il **Riferimento**  
nella **Prevenzione**  
in **Salute Animale**

---

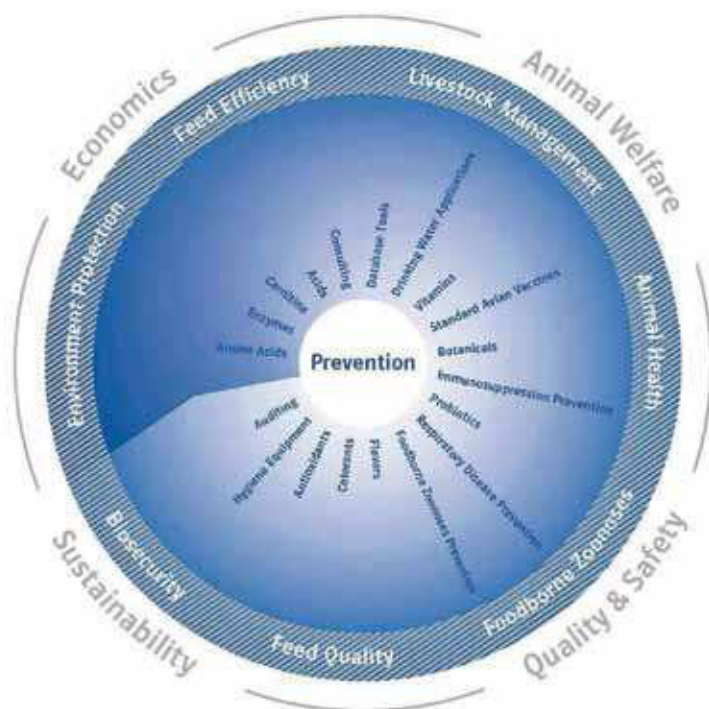


# Food for professionals



Huvepharma NV - Uitbreidingstraat 80 - 2600 Antwerp - Belgium  
Tel.: +32 3 288 1849 - Fax: +32 3 289 7845  
e-mail: [customerservice@huvepharma.com](mailto:customerservice@huvepharma.com)  
Per l'Italia: [paolo.schiavi@huvepharma.com](mailto:paolo.schiavi@huvepharma.com)  
[www.huvepharma.com](http://www.huvepharma.com)

- Vaccini per Avicoli
- Additivi per Alimentazione Animale



- ⇒ 80 anni di esperienza nella produzione animale.
- ⇒ Una gamma completa di prodotti che altre aziende non potrebbero avere.
- ⇒ Una visione completa della produzione degli animali destinati all'alimentazione umana.
- ⇒ Una competenza globale per affrontare le sfide del mercato, basandosi sul principio della Prevenzione.

... perché dobbiamo dimostrare che la produzione animale intensiva può benissimo essere in accordo con il benessere e la sostenibilità e che la nostra industria non solo sostiene tale idea, ma si pone anche come la sua forza trainante.

**Lohmann Animal Health**

Via Cadorna, 8/133  
20090 Buccinasco (MI), Italy  
Phone: + 39 02 45712447  
e-mail: office.italy@lohmann.de  
Fax: + 39 02 45704683  
[www.lohmann.de](http://www.lohmann.de)

**Prevention First.**





## Ci prendiamo cura dei vostri animali da reddito come fossero i nostri.

La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali. Per questo Novartis Animal Health, società multinazionale del settore farmaceutico, è impegnata da anni a ricercare, sviluppare e commercializzare prodotti veterinari di qualità in grado di combattere le più importanti patologie ed assicurare ai vostri animali da reddito un ambiente di vita più salubre. Come fossero i nostri.





Le manifestazioni scientifiche della SIPA per il 2013 sono realizzate grazie al contributo di:

- BAYER SANITA' ANIMALE
- CEVA SALUTE ANIMALE
- CHEMIFARMA
- COBB
- DOX AL ITALIA
- ELANCO ANIMAL HEALTH
- FATRO
- HIPRA
- HUVEPHARMA
- LOHMANN ANIMAL HEALTH
- MERIAL ITALIA
- MSD ANIMAL HEALTH
- NOVARTIS ANIMAL HEALTH
- PFIZER ITALIA
- TRE I



## PREFAZIONE

La terapia antimicrobica, non solo in avicoltura, è un prezioso strumento per tutelare la salute ed il benessere degli animali. Il suo utilizzo non deve però prescindere da valutazioni riguardanti l'instaurarsi di fenomeni di resistenza che possono ridurne l'efficacia.

L'utilizzo degli antimicrobici e le modalità del loro impiego rappresentano quindi un aspetto delicato ed importante nella gestione degli animali.

La Società Italiana di Patologia Aviare, nel corso dell'anno 2012, si è particolarmente impegnata nell'organizzare una tavola rotonda e il convegno nazionale al fine di sviluppare gli aspetti più salienti della terapia antimicrobica in avicoltura.

Con la tavola rotonda tenutasi a Padova la SIPA ha voluto approfondire aspetti teorici e pratici inerenti l'antibioticoresistenza e le implicazioni che possono presentarsi nel comparto della sanità pubblica.

Conseguentemente anche il convegno nazionale, occasionalmente tenutosi a Salsomaggiore Terme in autunno, ha ripreso l'argomento approfondendo maggiormente gli aspetti di un uso responsabile degli antimicrobici anche confrontandosi con realtà produttive straniere grazie alla relazione di ricercatori provenienti dall'Olanda.

Questi incontri hanno ambedue riscosso particolare interesse sia per la qualificata partecipazione di relatori nazionali ed esteri, sia per l'argomento di particolare attualità.

Questi eventi scaturiscono sempre dalle indicazioni dei soci che, durante l'assemblea, mettono in evidenza le problematiche attuali che verranno poi affrontate durante gli incontri annuali e le tavole rotonde. Tali incontri sono possibili anche grazie alla presenza costante e discreta di un gruppo di Aziende e Società sempre pronte a sponsorizzare i nostri eventi e che qui pubblicamente ringrazio.

Nel 2012 si sono tenute anche le elezioni del Presidente e del Consiglio Direttivo per il triennio 2013-2015 e che ha visto la riconferma di tutti i componenti. Ringrazio dunque i Soci che ancora una volta hanno riposto in me e nei consiglieri la loro fiducia.

*Dott. Guido Grilli*  
*Presidente SIPA*



# ATTI DEL LI CONVEGNO ANNUALE

Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 Ottobre 2012



## **INCONTRO**

**“Stato sanitario dell’avicoltura italiana:  
focus sulle principali malattie osservate  
durante il 2012”**





**LUIGI GAVAZZI e  
EMILIO MORANDINI**

**Stato sanitario del pollo da carne**

## STATO SANITARIO DEL POLLO DA CARNE

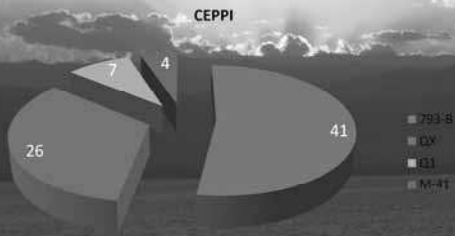
SOCIETA' ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE  
11 OTTOBRE 2012

LUIGI GAVAZZI – MORANDINI EMILIO

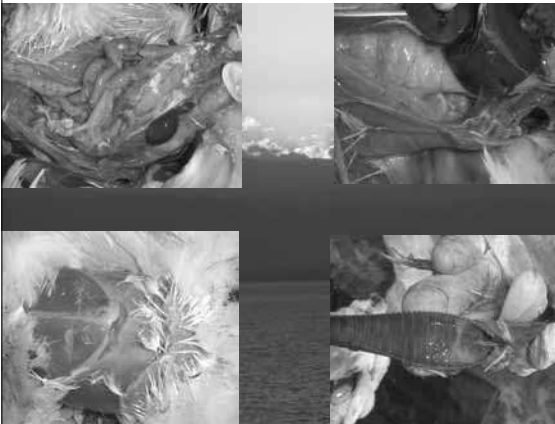
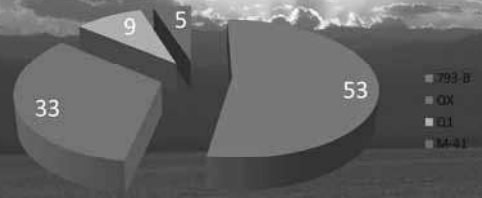
## BRONCHITE INFETTIVA

- TUTTE LE FORME RESPIRATORIE SONO STATE TESTATE PRELEVANDO TRACHEE, TONSILLE CECALI E RENI DA SOGGETTI MORTI
- 78 CEPPI SEQUENZIATI E 23 NON SEQUENZIABILI

## BRONCHITE INFETTIVA



## CEPPI DI BRONCHITE %

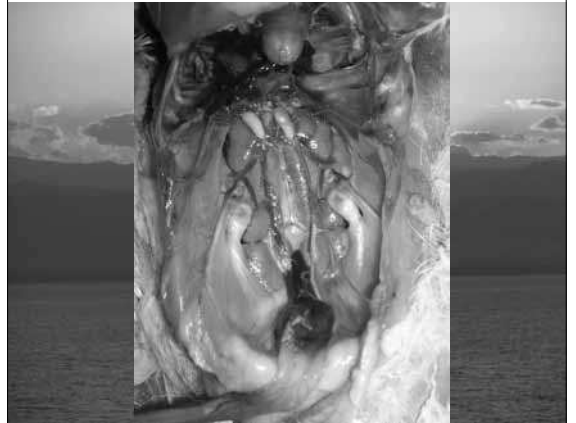


## MALATTIA DI GUMBORO

- TUTTI GLI EPISODI SOSPETTI SONO STATI CONTROLLATI PRELEVANDO LE BORSE DI FABRIZIO

## MALATTIA DI GUMBORO

- 34 CEPPI SEQUENZIATI: 10 DV86 E 24 VIRUS VACCINALI



## AMPV

- TUTTI I CASI SOSPETTI SONO STATI CONTROLLATI IN PCR PRELEVANDO LE TRACHEE O ESEGUENDO TAMPONI TRACHEALI
- AMPV sottotipo B riscontrati 22



- I fattori ambientali influiscono notevolmente sul decorso della malattia: una buona igiene, la densità non elevata dei capi ed adeguata ventilazione del capannone riducono notevolmente la gravità e la sua diffusione in allevamento




## LARINGO-TRACHEITE

- SONO STATI ESEGUITI TAMPONI TRACHEALI O PRELIEVI DI TRACHEE IN TUTTI I CASI SOSPETTI

### 2011-2012

- 3 Bs
- 1 Bg
- 7 Vr
- 3 Fc
- 1 Ra
- 1 Te
- 1 Bn
- 2 Fg
- 1 Is

- 🐔 17 focolai in broilers
- 🐔 2 galletti
- 🐔 1 capponi




## VAIOLO

- TRE EPISODI IN BROILER





## CLOSTRIDIOSI



### CLOSTRIDIUM PERFRIGENS

- ENTERITE NECROTICA E DISBATTERIOSI
- COSTANTEMENTE PRESENTE NEGLI ALLEVAMENTI, LA SUA INCIDENZA VARIA A SECONDA DI UNA SERIE DI FATTORI QUALI LA STAGIONALITA', L'ALIMENTAZIONE, LA CONDUZIONE DEGLI AMBIENTI



### CLOSTRIDIUM SEPTICUM (D.GANGRENOSA)

- Colpisce prevalentemente i polli in accrescimento tra le 4 e le 16 sett
- Ambiente caldo umido
- Insorgenza improvvisa
- Decorso molto rapido : 24 h
- Mortalità elevata : 1-2 % al giorno



### Lesioni

- Lesioni gangrenose di colore scuro a livello di cute e sottocute.
- Al tatto la parte colpita si presenta crepitante
- Cellulite enfisematosa o siero-emorragica
- Focolai di necrosi al fegato



### Prevenzione e controllo

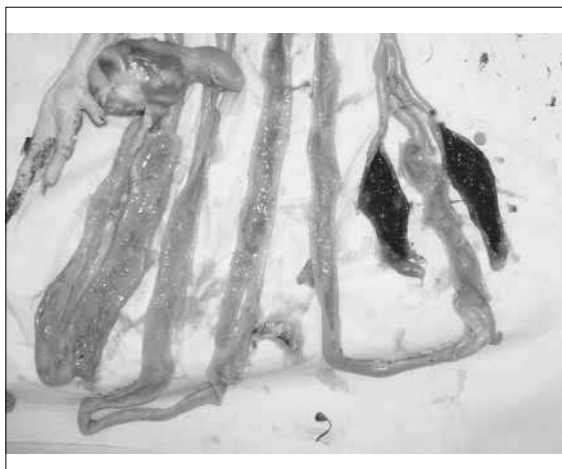
- Migliorare le condizioni igieniche in allevamento
- Prevenire o ridurre ove possibile gli stati di immunodepressione degli animali
- Stress vari
- IBD, Anemia Infettiva
- Coccidiosi

### CLOSTRIDIUM BOTULINUM

- TOSSINA TIPO C
- PARALISI FLACCIDA DELLE GAMBE, ALI, COLLO, PALPEBRE
- A CAUSA DELLA PARALISI DELLE PALPEBRE I VOLATILI SEMBRANO MORTI O IN COMA
- LA MORTE DA INSUFFICIENZA CARDIO-RESPIRATORIA
- DIVERSI UCCELLI AMMALATI SE MESSI DA PARTE CON ACQUA E MANGIME A DISPOSIZIONE SI POSSONO RIPRENDERE
- FONDAMENTALE RIMUOVERE PRONTAMENTE I SOGGETTI MALATI E MORTI



## COCCIDIOSI

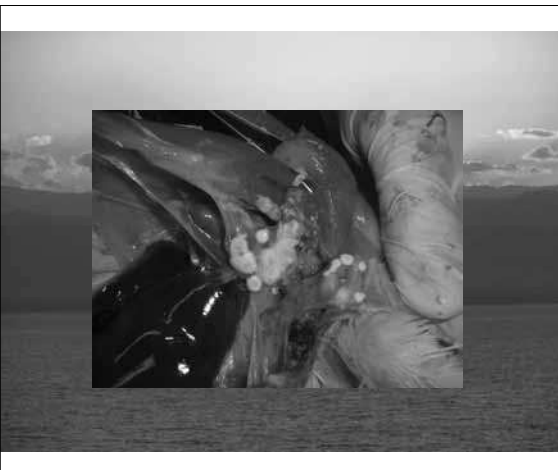
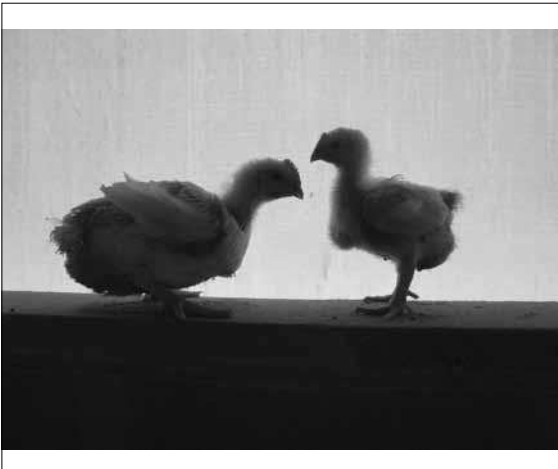


## ASPERGILLOSI

- ASPERGILLUS SPP (A.FUMIGATUS, A.FLAVUS)
- AMBIENTI CONTAMINATI (INCIDENTI IN INCUBATOIO)
- LETTIERE BAGNATE



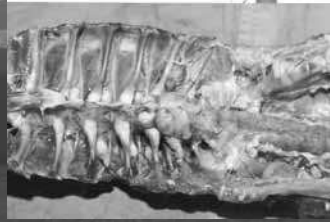




## SPONDILITE DA ENTEROCOCCHI

- GRAM +
- RIGUARDANO INFEZIONI EMBRIONALI CON MORTALITA' IN UOVO O INFEZIONI DEL RESIDUO DEL SACCO VITELLINO NEL PRIMO GIORNO DI VITA, DOVUTA A CATTIVA GESTIONE DELLE FASI DELLA VITA DEL PULCINO ("POOR CHICK QUALITY")
- NEGLI ULTIMI ANNI SEGNALATE OSTEOMIELITI A CARICO DELLE OSSA LUNGHE E CORPI VERTEBRALI

- OSSERVATA IN POLLI DI 4-5 SETTIMANE CON ISOLAMENTO DELL'ENTEROCOCCUS CECORUM DA OSTEOMIELITI DELLE VERTEBRE TORACICHE
- SINTOMATOLOGIA COSIDDETTA "KINKY-BACK" ASSOCIATA A SPONDILITE DA E.CECORUM E' IN AUMENTO
- DIFFICOLTA' DI DEAMBULAZIONE , DECUBITO PROLUNGATO SUI TARSIS E SUL COCCIGE, DIFFORMITA' DI ACCRESCIMENTO DEL GRUPPO
- ALCUNI SI AIUTANO CON LE ALI PER LA DEAMBULAZIONE





**DIEGO DA ROS**  
**Stato sanitario del tacchino da carne**

## Stato sanitario del tacchino da carne

D. Da Ros  
SIPA 2012

## Principali problematiche

- Enteriti
- LPAI
- TRT
- FAV2 HE
- POX
- Tecnopatie
- MG
- MS
- E.coli
- Pasteurella
- Riemerella
- Ort
- Aspergillosi

## Patologie enteriche

### Virali singole o associate

*Rotavirus, Astrovirus,  
Coronavirus, Adenovirus*

### Batteriche

*E. Coli, Salmonelle, Clostridium,  
Staphilococco, Bordetella Avium.*

### Parassitarie

Protozoi flagellati [Tricomonas,  
Histomonas (Heterachis gallinarum),  
Hexamita, Cochlosoma.]

Protozoi non flagellati  
Eimeria



## Patologie enteriche

### Sindrome multifattoriale

- Età compresa tra 1 e 4 settimane
- Nervosismo, pigolio, tendenza all'ammassamento, diarrea
- Dilatazione intestinale e ciecale con presenza di liquido e gas, assottigliamento delle pareti intestinali
- Riduzione delle capacità digestive e di assorbimento dell'intestino con marcato dismicrobismo

## Conseguenza delle enteriti

Quadri simil PEMS  
Poult enteritis and  
mortality sindrom

Deformazione degli arti e  
zoppie



## TRT

- Endemica.
- Sottotipo B >95% Sottotipo A < 5%.
- Vaccinazione spray in incubatoio.
- Riduzione delle forme giovanili (18-40gg) che presentano grave sintomatologia respiratoria con alta mortalità.
- più frequenti le forme tardive (70 – 80 gg) spesso complicate da cause batteriche.

## POX

- Endemico nel periodo tarda estate –autunno nelle zone umide.
- Trasmissione meccanica attraverso piccole ferite o insetti vettori oppure si propaga all'interno del gruppo attraverso aerosol di particelle dalle penne e dalle croste
- Forma difterica (rara) e cutanea (più comune) con formazione di scarti per difficoltà di assunzione dell'alimento o respiratoria.
- Vaccinazione per puntura alare a tre settimane circa protegge efficacemente il gruppo

## Enterite Emorragica

- Colpisce i tacchini al di sopra delle 4 settimane caratterizzata da depressione, feci emorragiche e mortalità variabile da 0,5% al 60% a seconda della patogenicità del ceppo
- In Italia è endemica segnalata per lo più in forma subclinica con immunodepressione.
- Il piccolo intestino è normalmente dilatato di colore scuro e contiene del sangue rosso brunastro. Milza ingrossata e marmorizzata
- Predisposizione a infezioni batteriche secondarie
- La vaccinazione con uno spento riduce l'entità delle lesioni ma non l'immunodepressione

## Micoplasmosi

- Sono state segnalate numerosi infezioni del tacchino da carne con sintomatologia respiratoria (sinusiti e aerosacculiti) per MG e sintomatologia respiratoria e articolare per MS prevalentemente in soggetti di età superiore alle 10 settimane spesso aggravata da infezioni batteriche secondarie (E.coli e Pasteurella)
- Presenza di forme sintomatiche con esito positivo PCR. Presenza di casi con positività PCR, assenza di sintomi e sierconversione
- Le misure di eradicazione applicate negli allevamenti di riproduzione hanno ridotto l'incidenza rispetto al passato
- La presenza di focolai è spesso determinata da disattenzioni nella gestione delle biosicurezze, elevata densità degli animali in determinate zone e la promiscuità con altre specie avicole

## Colibacillosi

- Patologia condizionata (stress ambientali, immunodepressione)
- Patogenicità spiccata per l'apparato respiratorio con polmoniti e setticemia
- Colisetticemia: morti improvvise con animali in buono stato di salute. Epato e spleno megalia con necrosi epatica e presenza di petecchie emorragiche
- Forma cronica: aerosacculiti con presenza di materiale caseoso spesso associata a pericardite e periepatite fibrinosa
- Da segnalare la comparsa di ceppi multiresistenti con sensibilità limitata a pochi principi attivi

## Polmoniti pasteurellari Riemerella anatipestifer

- Polmoniti pasteurellari: casi sporadici in animali adulti al di sopra dei 100 gg con lesioni prevalentemente polmonari
- Riemerella anatipestifer: segnalato in animali tra i 40 e 80 gg con sintomatologia respiratoria associata a sintomi nervosi

## ORT

- Segnalata in soggetti tra i 40 e gli 80 gg con forma respiratoria associata a grave polmonite fibrino prulenta
- Essudato muco emorragico con mortalità elevata e depressione del sensorio
- Localizzazione articolare con tenosinoviti purulente
- Spesso risposta alle terapie non soddisfacente
- La sierologia evidenzia numerose positività probabilmente dovuta all'elevata diffusione
- Le forme cliniche devono essere confermate dall'isolamento

## Aspergillosi

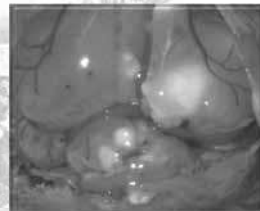
- Segnalata in soggetti di tutte le età
- Può derivare da problematiche di incubatoio (la sintomatologia è molto precoce) e di allevamento (lettiera, scarsi ricambi d'aria)
- Le lesioni possono interessare l'apparato respiratorio (sacchi aerei e polmoni) ma anche localizzarsi nel cervello
- Rappresenta ancora una delle maggiori cause di eliminazione delle carcasse al macello

## Aspergillosi

Apparato respiratorio



Meningite



## “Fame d'aria” da aspergillosi

giovane



adulto



## Istomoniasi

- Segnalazioni in tacchini di circa 40 gg di età
- epatite e tiflite



## Botulismo

- Primi sintomi a 20 gg con rari casi di paralisi flaccida
- Grave sintomatologia a 60 gg con paralisi flaccida degli arti e del collo e delle palpebre che ha colpito circa il 20% del gruppo con mortalità
- Il problema si è ripetuto a 100 gg con le medesime modalità

## Botulismo

Aspetti particolari



Aspetti particolari



## Botulismo

- sono stati inviati all'IZS di Treviso 10 sieri di animali con sintomatologia e campioni di intestino
- i sieri testati con antisieri specifici (mouse test) sono risultati 4 su 10 positivi
- un intestino è risultato positivo alla PCR con isolamento del clostridio

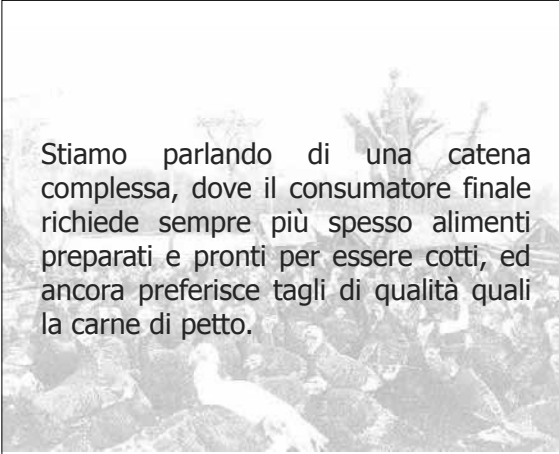
## Botulismo

- Ipotesi?
- Allevamento in stato di degrado con presenza di nidi di colombi e selvatici e guano nelle controsoffittature
- Lettiera con lolla di riso contaminata con spore?
- Risoluzione del problema attraverso il rifacimento dei tetti, pulizie, disinfestazione e derattizzazione

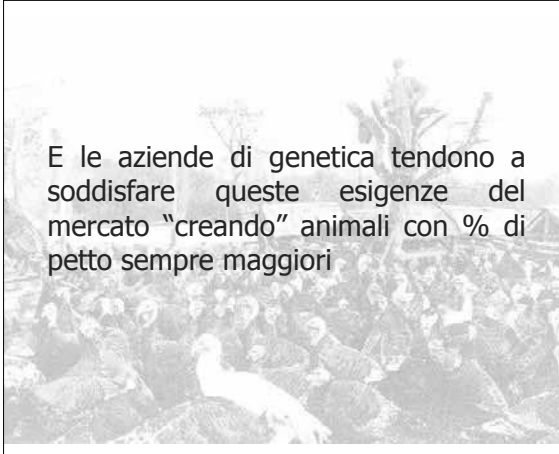
## Tecnopatie

Il mercato richiede animali sempre più pesanti e le aziende di genetica sono influenzate a selezionare per questi obiettivi.

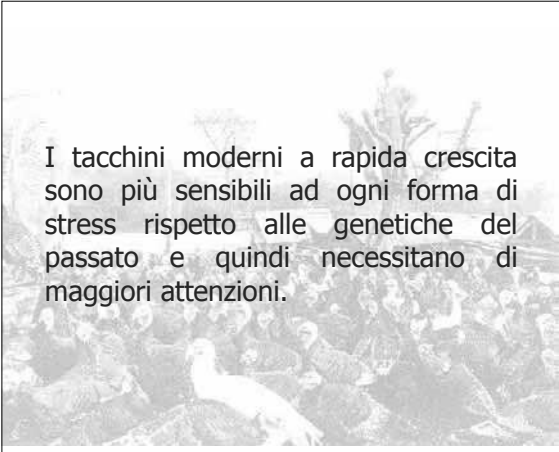




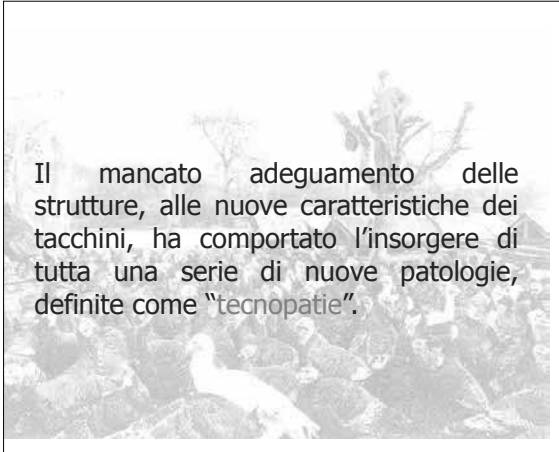
Stiamo parlando di una catena complessa, dove il consumatore finale richiede sempre più spesso alimenti preparati e pronti per essere cotti, ed ancora preferisce tagli di qualità quali la carne di petto.



E le aziende di genetica tendono a soddisfare queste esigenze del mercato "creando" animali con % di petto sempre maggiori



I tacchini moderni a rapida crescita sono più sensibili ad ogni forma di stress rispetto alle genetiche del passato e quindi necessitano di maggiori attenzioni.



Il mancato adeguamento delle strutture, alle nuove caratteristiche dei tacchini, ha comportato l'insorgere di tutta una serie di nuove patologie, definite come "tecnopatie".



## Pulcinaia

Basse temperature, correnti d'aria, alta umidità.



Ammassamento degli animali lettiera fredda ed umida.



Diarrea, piumaggio irregolare, formazione di scarti, scarso accrescimento, mancato appiattamento mortalità.

Alta temperatura, scarsa ventilazione, alta umidità.



Ambiente malsano, Asfittica. Ammoniaca.



Respiro affannosa, diarrea, scarsa crescita, mancato appiattamento, mortalità, ali con penne remiganti primarie sollevate dal corpo, favorisce la formazione di gozzi penduli.

## Cuore tondo



## ALCUNI ESEMPI DI TECNOPATIE SONO

1. ROTTURA DELL' AORTA
2. SINDROME DELLA MORTE IMPROVVISA
3. MIOPATIA DEL MUSCOLO PETTORALE PROFONDO
4. PROBLEMI SCHELETRICI
5. RIDOTTA RESISTENZA ALLE MALATTIE
6. REAZIONI DELLA PELLE DEL PETTO (borse sternali, graffiature , beccati ecc . ecc. )

## ROTTURA DELL'AORTA

1. VECCHIO FENOMENO
2. SOGGETTI A RAPIDA CRESCITA (GENETICA, ALIMENTAZIONE).
3. MAGGIORE NEI ♂ CHE NELLE ♀
4. CORRELATO ALLA PRESSIONE EMATICA
5. CORRELATO AGLI STRESS
6. CORRELATO ALLA CARENZA DEL RAME NELLA DIETA



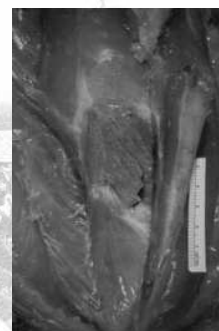
## SINDROME DELLA MORTE IMPROVVISA

1. FENOMENO RELATIVAMENTE RECENTE CHE PUO' AVERE ANDAMENTO TRANSITORIO
2. COLPISCE I ♂ DELLE ♀ TRA L'8ª E LA 20ª SETTIMANA
3. CARATTERIZZATA DA CONGESTIONE POLMONARE E SINDROME PERIRENALE EMORRAGICA
4. LEGATA ALLO STRESS ( CRESCITA RAPIDA, ECCITAZIONE, IPERATTIVITA', PROGRAMMA LUCE CONTINUO, ecc. ecc.)
5. UNA DELLE CAUSE E' IL RIDOTTO APPORTO D' OSSIGENO



## MIOPATIA DEL MUSCOLO PETTORALE PROFONDO

1. MONO O BILATERALE
2. ECCITAZIONE CON SBATTIMENTI FREQUENTI DELLE ALI
3. MECCANISMO : FENOMENI ISCHEMICI PER STRANGOLAMENTO LEGATI ALL'ECESSIVO SVILUPPO DELLE MASSE MUSCOLARI PETTORALI



## Reazioni della pelle del petto

### "Bottoni".

- Dermatite ulcerativa.
- Crescita di tessuto fibroso – connettivo circa 3 – 4 centimetri sotto la punta dello sterno.
- La causa è sconosciuta ed ha comunque poco a che fare con la conformazione.
- Una lettiera appiccicosa e dura ne accentua l'incidenza.

### 2. Vesciche sternali.

- Ispezzimento della pelle del petto che porta a:
- Corde (indurimento, tessuto connettivo), che porta a:
- Vesciche (diversi fluidi tra le corde).

## Bottoni sternali



## Borse sternali



## Graffiati

In allevamento



Al macello



## Lesioni agli arti

### Management non corretto

- Elevata densità
- Errate temperature e umidità dell'ambiente
- Scarsa ventilazione o non adeguati ricambi d'aria

Possono determinare fenomeni di malassorbimento con diarrea e peggioramento della qualità della lettiera





## Ringraziamenti

Dott. Marco Della Valentina (gruppo Amadori)  
Dott. Giovanni Ortali (gruppo AIA)  
Dott. Luigi Gavazzi (gruppo Amadori)  
Dott.ssa Raffaella Ceruti (gruppo Amadori)  
Dott. Salvatore Catania (IZSVE)  
Dott. Calogero Terregino (IZSVE)  
Dott. Luca Bano (IZSVE)





**CALOGERO TERREGINO**  
**Epidemia da H5N2 LPAI 2012**



## Epidemia da H5N2 LPAI 2012

Calogero (Lillo) Terregino

Centro di Riferenza Nazionale, Laboratorio OIE e FAO per l'Influenza aviaria e la malattia di Newcastle  
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro, Padova



## AI in Italia 2011

[Mappe 31\\_12\\_2011.pdf](#)

[report 31\\_12\\_2011.pdf](#)



51° Convegno Annuale SIPA

## Epidemia da H5N2 LPAI 2012

10 FOCOLAI (31.08.2012 - 08.10.2012)

6 focolai in tacchini da carne in Lombardia (BS e MN)

1 svezizzatore in Lombardia (MN)

1 all. rurale in Toscana (Prato)

2 focolai in Veneto: 1 ornamentale (TV) e 1 svezizzatore (VR)



[Mappa focolai Italia.pdf](#)

[mappa focolai Lombardia.pdf](#)

[report\\_09\\_10\\_2012.pdf](#)



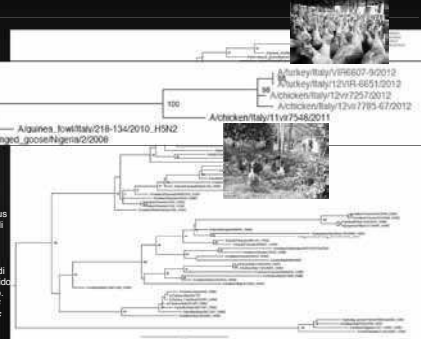
51° Convegno Annuale SIPA

## Analisi dei virus isolati

Rispetto al virus A/chicken/Italy/11v/7548/2011 (NA) considerato come il "proprietore" del gruppo del virus H5 del recente focolaio (99% di similitudine nt), il 6607/5 (BS) presenta 5 sostituzioni aminoacidiche in HA

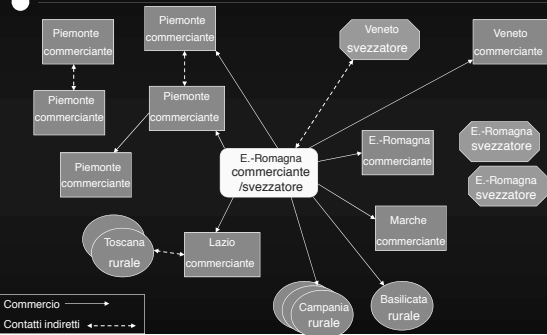
Tra queste vi è la sostituzione di amir. acido (E) con un amminoacido basico (K) nel sito di clivaggio.

7548/2011 PORETR GLF  
6607-5/2012 POR-TR GLF



51° Convegno Annuale SIPA

## Esempio di connessioni epidemiologiche tra allevamenti rurali (focolai LPAI H7N3 - 2009)



51° Convegno Annuale SIPA

## Connessioni epidemiologiche settore rurale - industriale

Data l'impossibilità di un efficace controllo degli allevamenti rurali occorre creare un'efficace separazione funzione tra il mondo dei rurali ed i settore avicolo industriale



*La sicurezza sanitaria di un allevamento è come un muro a secco dove ogni pietra sostiene l'altra e dove la sottrazione di un solo elemento può comportare il crollo dell'intero muro.*



51° Convegno Annuale SIPA

## Misure straordinarie di sorveglianza e controllo (nota MS 0018075-P-05.10.2012)

**PUNTI PRINCIPALI**

- Divieto di movimentazione dei tacchini da carne dalla Lombardia
- Monitoraggio straordinario negli allevamenti di tacchini da carne di Veneto, Emilia Romagna, Lombardia e Piemonte ogni 15 giorni
- Controlli pre-carico in riproduttori, ovaiole, anatre e oche nelle 96 ore precedenti il carico
- Intensificazione delle misure di biosicurezza
- Separazione funzionale tra aziende dei territori coinvolti dall'epidemia e aziende delle altre regioni (predisposizione di un protocollo operativo da parte delle ditte)
- Divieto accasamenti a sessi misti negli allevamenti dei tacchini da carne sul territorio identificato a rischio
- Blocco accasamenti di tacchini da carne nelle aree a maggior rischio

51° Convegno Annuale SIPA

## Grazie per l'attenzione

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie**  
 Calogero (Lillo) Terregino  
 Ph.: +39 049 8084377 | cterregino@izsvenezie.it  
 www.izsvenezie.it

51° Convegno Annuale SIPA

## Influenza aviaria: the never ending story

2009

4 focolai in tacchini da carne in Lombardia e Veneto da **H5N7 LPAI** (20/04-07/04/09)

33 focolai (1 tacchini da carne in Umbria; 1 in polli riproduttori in Piemonte; 31 nel circuito rurale) in Piemonte (5), Veneto (2), Emilia Romagna (5), Marche (1), Toscana (2), Lazio (1); Campania (14), Basilicata (1) da **H7N3 LPAI** (29/05-31/12/09)

2 focolai nella selvaggina allevata in Piemonte e Lombardia da **H5N2 LPAI** (16-18/11/09)

51° Convegno Annuale SIPA

## Influenza aviaria: the never ending story

51° Convegno Annuale SIPA

## Misure di prevenzione, controllo e sorveglianza nel settore avicolo rurale

**PUNTI PRINCIPALI**

- Rispetto delle misure di biosicurezza e requisiti igienico e sanitari fondamentali in allevamento e nelle aree adibite a fiere e mercati
- Tracciabilità e rintracciabilità delle partite commercializzate
- Osservanza di specifici requisiti gestionali:
  - registro carico/scarico
  - carico e vendita animali all'esterno dell'azienda dove sono gli animali
  - introduzione animali solo da altre aziende accreditate
  - divieto di reintroduzione animali che hanno partecipato a mercati
  - accertamenti sanitari e controlli ufficiali periodici per il rilascio dell'accREDITAMENTO alla commercializzazione extraregionale

51° Convegno Annuale SIPA





**ANTONIO CAMARDA e  
LUDOVICO DI PINETO**

**Stato sanitario della gallina ovaiola  
in Italia**

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA  
Salsomaggiore, 11-12 ottobre 2012



## Stato sanitario della gallina ovaioia in Italia

Antonio Camarda\*, Ludovico Dipineto<sup>§</sup>

\*Dipartimento di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"  
§Dipartimento di Patologia e Sanità Animale - Università degli Studi di Napoli "Federico II"

1

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Hanno contribuito...

Luca Bano	IZS Venezia - Treviso
Ezio Bianchi	Gruppo Veronesi
Mauro Castello	Medico Veterinario Libero Professionista
Salvatore Catania	IZS Venezia - Padova
Raffaella Ceruti	Gruppo Amadori
Elena Circella	Università degli Studi di Bari
Luigi Gavazzi	Gruppo Amadori
Davide Giovanardi	Gruppo Veronesi
Paolo Guarnieri	Gruppo Avinord
Paola Massi	IZSLER- Forlì
Antonino Messina	Medico Veterinario Libero professionista
Fausto Ruffini	Gruppo Amadori
Fabrizio Russo	Medico Veterinario Libero Professionista
Alessandro Scolari	Asl Cremona
Calogero Terregino	IZS Venezia - Padova

Antonio Camarda - Ludovico Dipineto

2

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

- Malattie virali
- Malattie batteriche
- Malattie parassitarie
- Micotossicosi
- Altre problematiche sanitarie

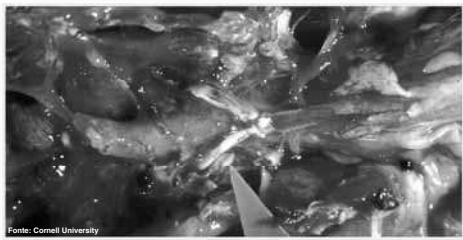


Antonio Camarda - Ludovico Dipineto

3

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Bronchite Infettiva



Fonte: Cornell University

4

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Bronchite infettiva

Endemica negli allevamenti multietà  
Ben controllata dalle vaccinazioni, soprattutto le forme respiratorie da 793B



Antonio Camarda - Ludovico Dipineto

5

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Bronchite infettiva

- ◆ Circa il 30% degli allevamenti positivi
- ◆ I dati sierologici confermano questo rilievo. rialzi nel titolo anticorpale sono associati a calo della deposizione e riduzione della qualità delle uova
- ◆ Prevalenza di virus vaccinali (4/91, M41) e ceppo inglese (<99% omologia) nelle regioni del Nord-Est
- ◆ Segnalata con una certa frequenza in Sicilia dove si è manifestata con tipici problemi di deposizione e qualità delle uova
- ◆ Anche qui M41 e 793B sono prevalenti
- ◆ Segnalati It2 e QX

	2011*		2012*	
	N	%	N	%
793B	141	54	94	54
QX	58	22	41	24
624I	36	14	2	1
Q1	-	-	17	10
M41	22	8	16	9
IT02	4	2	1	1
D274	-	-	2	1
TOTALE	261		173	

Antonio Camarda - Ludovico Dipineto

6

## Bronchite infettiva - Il ceppo QX

- ❖ Rappresenta il sierotipo prevalente in tutti i report di laboratorio in particolare nelle regioni del Nord
- ❖ False ovaiole - Associate al ceppo QX
- ❖ Prevalenza variabile nel gruppo dal 5% al 30%



Foto: Marco P. Adorni, Azienda Sperimentale San. Gall. Padova

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

7

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## Bronchite infettiva - Complicanze

- ❖ Segnalazioni di forme complicate con
- ❖ Metapneumovirus - (TRT)
- ❖ *Mycoplasma gallisepticum*
- ❖ *Escherichia coli*



Foto: Cornell University

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

8

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### Laringo tracheite infettiva

Segnalata sull'intero territorio italiano con forme cliniche caratterizzate da bassa morbilità e ridotta mortalità

Alcuni focolai successivi alla vaccinazione nelle pollastre



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

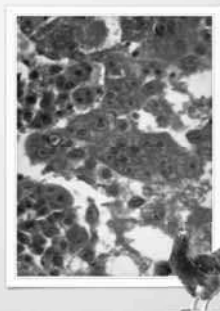
9

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### LARINGO TRACHEITE INFETTIVA

	2011		2012		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%
N. totale casi	76	-	34	-	110	-
Ovaiole	31	40,78	15	44,11	46	41,81
Pollastre	2	2,6	1	2,94	3	2,72
Riproduttori	22	28,9	13	38,23	35	31,81



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

10

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### LARINGO TRACHEITE INFETTIVA

Un focolaio in Trentino. 10% degli animali con sintomatologia e lievi ripercussioni sulla produzione di uova

focolaio autoestinto  
Eliminazione dei soggetti maggiormente compromessi

Segnalati focolai complicati da *Mycoplasma gallisepticum*  
calo della deposizione del 15% x 2 settimane



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

11

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### Influenza Aviaria -LPAI

Positività sierologiche per sottotipo H5

- 1 - Calabria - allevamento da 1300 capi
- 2 - Campania - allevamento da 4800 capi
- 3 - Campania - Allevamento da 70



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

12

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Difterovaiolo






- ❖ Forma cutanea
  - ❖ Diagnosticata in Campania in gruppi di ovaiole in batteria
  - ❖ Vaccinate durante la fase di pollastra con un solo ago
  - ❖ Si è presentata con classici sintomi
    - ❖ abbattimento
    - ❖ calo della deposizione lieve
    - ❖ lieve mortalità
    - ❖ tipiche lesioni cutanee

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 12 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Difterovaiolo






- ❖ Forma differica
  - ❖ Osservata in Campania in un gruppo di 15000 galline ovaiole allevate in gabbie arricchite.
  - ❖ Sintomi e lesioni
    - ❖ Fame d'aria
    - ❖ Membrane difteriche a carico delle prime vie respiratorie
    - ❖ Mortalità elevata
    - ❖ 8-20 capi/die

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 13 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## PNEUMO VIRUS




Segnalati sporadicamente nel Nord Italia casi di positività al sierotipo B in associazione a cali di produzione

CAUSA REALE?  
Complicazioni da E. coli

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 15 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Malattia di gumboro





Occasionale in pollastre di 30-35 giorni

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 16 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Malattia di Gumboro






- ❖ 1 caso in Campania su soggetti di 21 gg di vita
  - ❖ Depressione
  - ❖ Tremori
  - ❖ Anoressia
  - ❖ Petecchie emorragiche a carico dei muscoli della coscia
  - ❖ Petecchie emorragiche a carico tra stomaco muscolare e ghiandola
  - ❖ Splenomegalia
  - ❖ Aumento di volume della Borsa che appariva ripiena di essudato cremoso giallastro

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 17 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Malattia di Marek




Due focolai molto gravi nel 2012

Mortalità del 30%

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 18 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Enteriti virali

Osservate soprattutto in pollastre colpite soggetti di 20-25gg di vita

Mortalità ?



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 19 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Malattie ad eziologia batterica



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 20 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Malattie batteriche

### MYCOPLASMOSI

Mycoplasma gallisepticum  
Mycoplasma synoviae  
Altri Mycoplasmi



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 21 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Mycoplasmosi

Patologia estremamente diffusa in tutte le regioni e legata essenzialmente a

M. gallisepticum  
M. synoviae



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 22 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Mycoplasma gallisepticum

Abbastanza diffuso. le vaccinazioni (6/85, TS11) contengono le manifestazioni cliniche non impediscono la circolazione di germe .

Rotture dopo la 40<sup>a</sup> sett. e difetti classici alle uova con calo della deposizione

Lavoro di genotipizzazione dei ceppi Italiani presentato da Sez Fori



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 23 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Mycoplasma Synoviae



Endemico in Italia è la specie di Mycoplasma prevalente

Si presenta con tropismo all'apparato riproduttore

Tipiche lesioni del guscio

Scarsa sintomatologia respiratoria



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato 24 Salsomaggiore, 11 ottobre 2012

## Mycoplasma Synoviae



Non tutti i gruppi infetti presentano la sintomatologia clinica  
Il sierotipo D (patogeno) è rappresenta il 40% degli isolati (presentazione ad Hoc IZS Padova)



LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

Antonio Casarà - Ludovico Dipinato

25

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### MycoplasmOSI



Infezioni Miste  
Positività nello stesso allevamento per

- *M. gallisepticum* + *M. gallinarum*

*M. gallisepticum* + *M. synoviae*



Antonio Casarà - Ludovico Dipinato

26

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### Colibacillosi



Antonio Casarà - Ludovico Dipinato

27

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### Colibacillosi

- ◆ Frequente, molto spesso in associazione con le Mycoplasmosi
- ◆ Segnalata maggiormente frequente nel periodo estivo o nei periodi di stress
  - ◆ Raggiungimento del picco
  - ◆ Micolossicosi
  - ◆ Caldo
  - ◆ Forme infettive concomitanti
- ◆ Segnalati alcuni episodi con sintomatologia nervosa in Sicilia ma anche in Puglia
- ◆ Molto frequente in Campania dove si presenta con forme di colisetticemia e ovoperitonite caratterizzate da alta mortalità.
- ◆ Casi occasionali di onfalite in pulcini alla schiusa



Antonio Casarà - Ludovico Dipinato

28

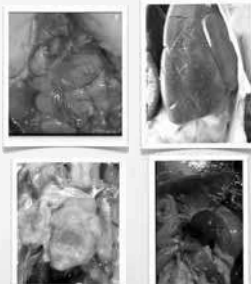
Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## Tifosi aviare



## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

- ◆ Sembra che la malattia stia riguadagnando qualche posizione nella classifica delle malattie segnalate in Italia
- ◆ Malattia descritta a partire dalle 27 sett.
- ◆ La malattia si presenta anche in allevamenti vaccinati (probabilmente già presente al momento della vaccinazione).
- ◆ Mortalità contenuta anche se malattia ha un andamento ciclico durante la produzione



Antonio Casarà - Ludovico Dipinato

29

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

### *S. typhimurium* - *S. enteritidis* - Altre Salmonelle

- ◆ Pochi dati su questo argomento. Segnalazioni di isolamenti *S. Typhimurium* e *S. enteritidis* mi sono giunti come riscontro sporadico.
- ◆ Si riscontrano in allevamenti in cui erano già state precedentemente segnalate.
- ◆ Caso Clinico: Mortalità dello 0,44% settimanale per peritoniti da *S. enteritidis*
- ◆ Riscontro in autocontrollo (da feci) di sierotipi minori in alcuni allevamenti del Nord
  - ◆ *S. infantis*
  - ◆ *S. Branderup*
  - ◆ *S. Newport*
- ◆ Secondo alcuni la % di isolamento di Salmonelle minori è di circa il 30%



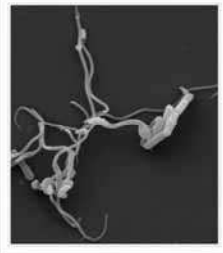
Antonio Casarà - Ludovico Dipinato

30

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

## Spirochetosi intestinale

- ❖ In diminuzione rispetto alle segnalazioni del 2005
- ❖ Effetti negativi sulla produzione
  - Ⓛ > dell'indice di conversione
  - Ⓛ > della umidità della pollina
  - Ⓛ > della % di uova sporche
  - Ⓛ Diarrea profusa



### Caso Clinico

## Spirochetosi intestinale

- ❖ Azienda di 20.000 ovaiole
- ❖ Età 43 sett
- ❖ Indici di produzione peggiorati
- ❖ Aumento della quantità di acqua nella pollina
- ❖ Sintomatologia enterica aspecifica
- ❖ Aumento della quantità di mosche
- ❖ Agenti eziologici: *B. intermedia* - *B. alvinipulli*



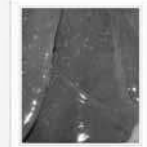
## Spotty liver disease - Vibriosi Aviare

- ❖ Segnalata in numerosi allevamenti di ovaiole
- ❖ Si presenta preferibilmente in Estate
- ❖ Ricompare nello stesso ciclo e nei successivi sempre negli medesimi capannoni.
- ❖ Mortalità che può divenire importante (5-7% fino al 15%) se non si interviene



## Spotty liver disease - Vibriosi Aviare

- ❖ Influenza possibile anche sulla % di uova deposte
- ❖ Gli esami di laboratorio sono abbastanza contraddittori
- ❖ A volte si isola *Campylobacter jejuni*.
- ❖ Gli esami istopatologici evidenziano una diffusa necrosi
- ❖ La terapia antibiotica risolve la sintomatologia e la mortalità in pochi giorni



## Clostridiosi - Enterite necrotica

- ❖ Si riscontrano sempre più frequentemente
- ❖ Segnalazioni in Piemonte, Emilia, Veneto, Campania ...
- ❖ Localizzazione prevalente il cieco
- ❖ Segnalati quadri sistemici di enterotossitemia
- ❖ La malattia è frequentemente associata a parassitosi (Ascariidiosi, Coccidiosi)
- ❖ Casi di malattia in pulcini di 30 giorni in associazione a coccidiosi



## Altre Forme Batteriche - Enteriti ad eziologia non nota

- ENTERITI ASPECIFICHE
  - ❖ Si tratta di forme di enterite catarrale/necrotica in cui non si isola *C. perfringens*.
- STAPHYLOCOCCOSI
- PERITONITE PER DEPOSIZIONE ADDOMINALE DA *GALLIBACTERIUM ANATIS* (già *Pasteurella anatis*)
- COLERA AVIARE
  - ❖ Una sola segnalazione in galline a terra di 50 settimane





LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## artropatia amiloide

- ❖ Sporadicamente osservata nelle pollastre con evidenti esiti di nanismo




Foto: Paolo P. A. C. Di Lorenzo - Laboratorio di Patologia Veterinaria

www.pisa.unipi.it

Antonio Camarda - Ludovico Diptato 37 Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## PARASSITOSI



Antonio Camarda - Ludovico Diptato 38 Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Dermanyssus gallinae

- ❖ Rappresenta la parassitosi più diffusa.
- ❖ 40-50% degli allevamenti infestati
- ❖ Problemi nella gestione e nel trattamento della parassitosi
- ❖ Segnalati casi di mortalità in ovaiole fortemente infestate in Campania





Antonio Camarda - Ludovico Diptato 39 Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Ascariidiosi

- ❖ Si segnalano numerosi casi di ascariidiosi in allevamenti di galline ovaiole a terra
- ❖ Un caso di malattia associato a necrosi stellata del fegato (Summer hepatitis).
- ❖ Osservata anche in Campania in soggetti a terra di 65 settimane
- ❖ La parassitosi può avere ripercussioni gravi sulla produzione
- ❖ Si osserva regressione dell'apparato riproduttore e crollo della qualità del guscio



Antonio Camarda - Ludovico Diptato 40 Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Coccidiosi

- ❖ Segnalati casi in pollastre a terra

Indagine su 30 gruppi di ovaiole di

Veneto	Emilia Romagna
Lombardia	

**38%** di oocisti nelle feci

**30%** circa di uova di ascariidi nelle feci

**1/3** circa di positività da ascariidi provenienti da gabbie arricchite





Dati IZS - Treviso

Antonio Camarda - Ludovico Diptato 41 Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

## Altre Parassitosi

- ❖ Istomoniasi
- ❖ Teniasi
- ❖ Heterakiasi
- ❖ Capillariosi
- ❖ Tricostrongilii
  - ❖ Episodi osservati in allevamenti a terra
- ❖ Aspergillosi
  - ❖ Segnalata occasionalmente soprattutto in pulcini accasati su lettiera in paglia

Antonio Camarda - Ludovico Diptato 42 Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

# MICOTOSSICOSI



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

# Micotossicosi

- ❖ Segnalati problemi dovuti alla presenza di micotossine nel mangime
- ❖ Prevalenti le forme da DON e T2
- ❖ In Campania si è osservata nel periodo febbraio-aprile e luglio-agosto
- ❖ intossicazione caratterizzata da bassa % di deposizione fino alla 22 settimana
- ❖ calo della deposizione all' 23a settimana



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

44


LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

# Micotossicosi

- ❖ Sintomatologia osservata
- ❖ Spesso i casi sono subclinici
  - ❖ erosioni in cavità orale ed allo stomaco
  - ❖ nervosismo
  - ❖ cannibalismo
  - ❖ riduzione della qualità del piumaggio
  - ❖ anemia
  - ❖ enterite
  - ❖ melena
  - ❖ aumento della mortalità



Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

45

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

# Altre problematiche sanitarie

- ❖ Neuropatia periferica nelle pollastre
- ❖ Cannibalismo
- ❖ Sindrome del fegato grasso
- ❖ Eccesso di mosche
- ❖ Gabbie arricchite/ galline a terra/Aviari
  - ❖ > della mortalità
  - ❖ > della % di uova a guscio rotto/incrinato
  - ❖ cali di deposizione da stress da caldo



Fonte: Mauro Castello

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

46

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

Salomaggiore, 11 ottobre 2012

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA



Grazie per l'attenzione!

Antonio Camarda - Ludovico Dipinato

47

LI CONGRESSO NAZIONALE SIPA

Salomaggiore, 11 ottobre 2012



## **CONVEGNO**

**“Uso responsabile degli antimicrobici  
in avicoltura”**



**DIK MEVIUS**  
**Antimicrobial use in poultry**  
**and consequences for human health**



## Antimicrobial use in poultry and consequences for human health

Dik Mevius



ANIMAL VETERINARY INSTITUTE  
Netherlands

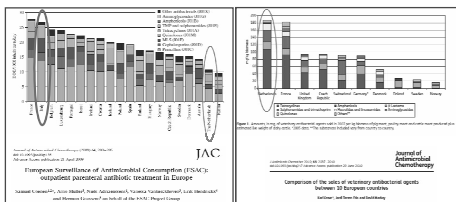
SDA

Universiteit Utrecht

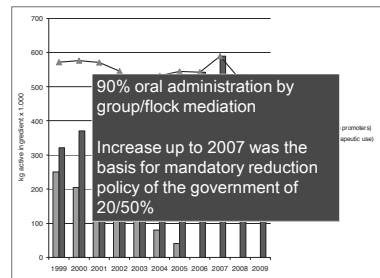
## Content

- Antibiotic usage in The Netherlands
  - Humans vs animals
  - Poultry
  - Data from DK and G
  - Usage of ceftiofur in poultry
- Antimicrobial Resistance in poultry
  - ESBLs
  - Relationship with humans
- Measures implemented in NL to control usage
  - (and resistance)

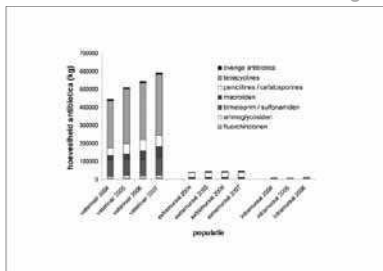
## Antibiotic usage in humans and animals in Europe



## Antibiotic use in animals in NL (Source FIDIN)



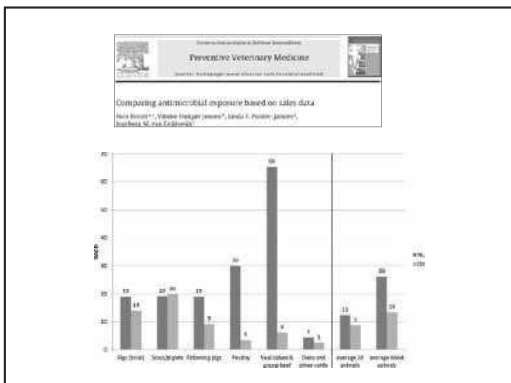
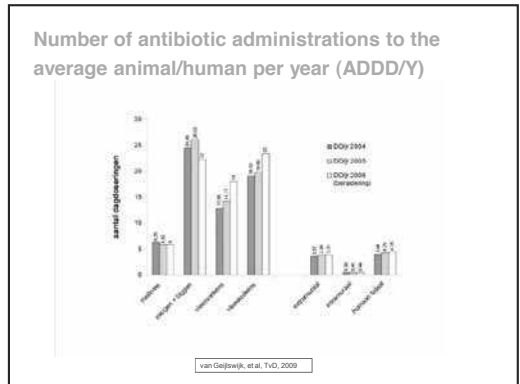
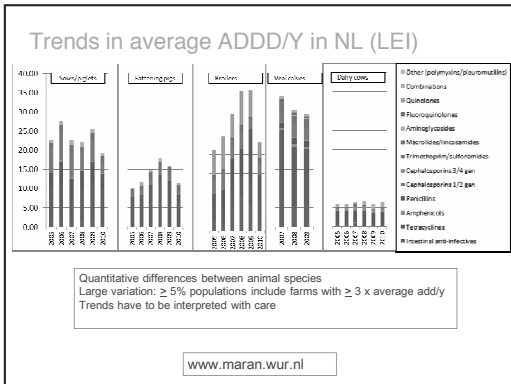
## Animal versus human use in kg



## Sales data versus DDD

- Sales
  - In KG product sold
  - Not specified by animal species
  - Not related to exposure of animals
  - Rough estimate
- Animal Defined Daily Dosages
  - Register all antibiotics supplied (farm)
  - Table with defined standard dosages per active substance
  - Calculate the kg's that can be treated
  - Relate that to the number of animals
  - Precise estimate to compare farms/vets/countries





Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen

Leibniz 10  
 45556 Beckinghausen  
 email: poststelle@lanuv.nrw.de

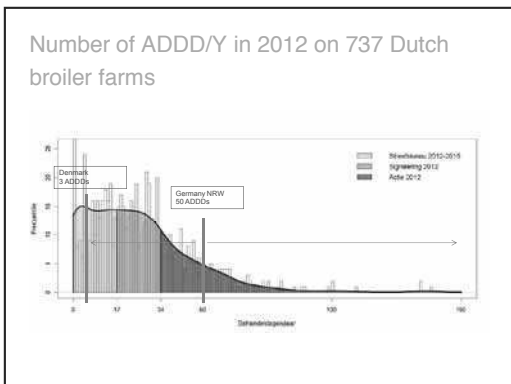
### Überarbeiteter Abschlussbericht

Evaluierung des Antibiotikaeinsatzes in der Ferkelaufzucht  
 Rockinghausen, den 02.04.2012

Abteilung 7  
 Fachbereich Tier, Tierärztliche Abteilung

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Arzneimittelsatzdaten bei Auswertung aller 984 erfassten Mastdurchgänge**

Mastdurchgänge	Anzahl	984
Mastdurchgänge ohne Behandlung	Anzahl	155
Mastdurchgänge mit mind. einer Behandlung	Anzahl	829
Behandlungen gesamt	Anzahl	2192
Behandlungen / behandelten Mastdurchgang	durchschnittl. Anzahl	2,6
Eingesetzte Wirkstoffe / Mastdurchgang	durchschnittl. Anzahl	1
bei behandelten Tieren	Anzahl max.	8
	durchschnittl. Anzahl	3,4
Behandlungsdauer (Tage) / Mastdurchgang	Anzahl min.	1
bei behandelten Tieren	Anzahl max.	24
	durchschnittl. Anzahl	7,6



**United States**

**NAXCEL®**  
 (ceftiofur sodium)  
 Sterile Powder

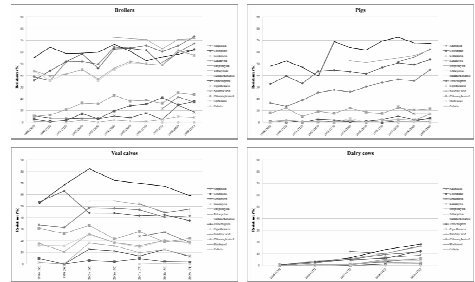
**The One to Use First to Control Early Chick Mortality**

## Ceftiofur use in Dutch poultry

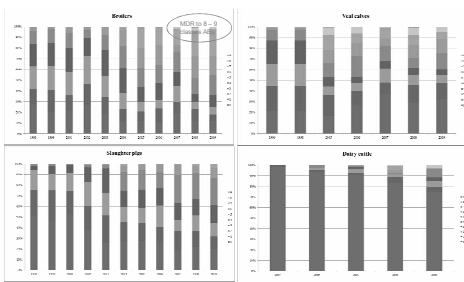
- Since app. 1993 – 2001 licenced in poultry in EU, withdrawn after 2001 because no MRL for poultry >> administration in poultry only legal according to the cascade rule
- Used in:
  - Reproduction animals (GP, P) (until 2010 in NL, other EUMSs??)
    - In day-old chicks SC injection
    - In-ovo
  - Broilers hatcheries
    - Spray in NL and B (until March 2010)

## Resistance in 2009

(E. coli as commensal in the GI-tract) (MARAN-2009)



## Expressed as multi-drug resistance



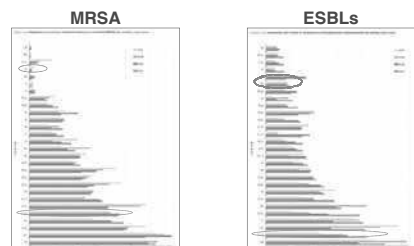
## What does this mean

- Dutch food-producing animals are an ideal environment for multidrug resistant organisms
  - Risk??
    - Animal health?
      - Yes, if they cause infections
    - Public health?
      - Yes if:
        - » Food-borne pathogens
        - » Zoonotic organisms
        - » Transferable genes

## Relation between resistance in animals and humans?

- In spite of long term differences in usage, the resistance levels in Dutch Health care are low!
- So does a relation with resistance in animals exist?
  - Unfortunately, yes
    - MRSA!
    - ESBLs!

## EARSS-net 2010 report (ECDC)



## Livestock associated MRSA (ST398)

### Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming

Andreas Voss,<sup>†</sup> Frans Loeffen,<sup>†</sup> Judith Bakker,<sup>\*</sup> Corne Klaassen,<sup>†</sup> and Mireille Wulf<sup>\*</sup>



## Live Stock associated MRSA (ST398)

- Many pigs and veal calves carry LA-MRSA in their noses (poultry, horses, companion animals...)
- Increased risk for carriage of farmers and vets
- Global problem
- In NL, measurable effects in human health care
  - Infections
  - Increased costs

## Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBLs)

- Enzymes that inactivate beta-lactam antibiotics
  - Penicillin, ampicillin, amoxicillin
  - All cephalosporins
- Consequence for infections with ESBL-producers:
  - Impaired treatment, increased risk for patients
- Genes are transferable on plasmids (*E. coli*/Salmonella)
  - Transmission of ESBLs also via the food-chain!!!

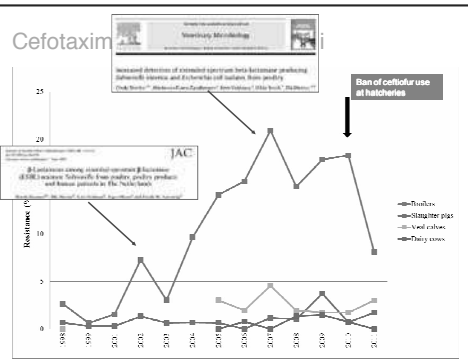


## Types of Beta-Lactamases

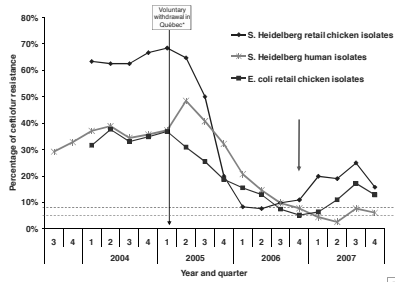
- Beta-Lactamase
  - Penicillinase  $bla_2$  (*S. aureus*)
  - TEM-1, SHV-1 (Enterobacteriaceae)
- ESBLs
  - TEM-derivatives, SHV-2 and derivatives, CTX-M, OXA, PER, VEB, GES
- AmpC-group (CMY, DHA etc)
- Carbapenemases (KPC, OXA, IMP, VIM, NDM)

Table 3. Major families of  $\beta$ -lactamase of clinical importance, adapted from (Bazin and Tenover 2016)

Enzyme	Functional group or subgroup	No. of amino acids	Representative enzymes
AmpC	TEM	28	TEM-1, TEM-2, TEM-3
	SHV	28	SHV-1, SHV-2, SHV-3
	CTX-M	28	CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-18, CTX-M-19, CTX-M-20, CTX-M-21, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-24, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-27, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-30, CTX-M-31, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-34, CTX-M-35, CTX-M-36, CTX-M-37, CTX-M-38, CTX-M-39, CTX-M-40, CTX-M-41, CTX-M-42, CTX-M-43, CTX-M-44, CTX-M-45, CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50, CTX-M-51, CTX-M-52, CTX-M-53, CTX-M-54, CTX-M-55, CTX-M-56, CTX-M-57, CTX-M-58, CTX-M-59, CTX-M-60, CTX-M-61, CTX-M-62, CTX-M-63, CTX-M-64, CTX-M-65, CTX-M-66, CTX-M-67, CTX-M-68, CTX-M-69, CTX-M-70, CTX-M-71, CTX-M-72, CTX-M-73, CTX-M-74, CTX-M-75, CTX-M-76, CTX-M-77, CTX-M-78, CTX-M-79, CTX-M-80, CTX-M-81, CTX-M-82, CTX-M-83, CTX-M-84, CTX-M-85, CTX-M-86, CTX-M-87, CTX-M-88, CTX-M-89, CTX-M-90, CTX-M-91, CTX-M-92, CTX-M-93, CTX-M-94, CTX-M-95, CTX-M-96, CTX-M-97, CTX-M-98, CTX-M-99, CTX-M-100
	PER	28	PER-1, PER-2, PER-3, PER-4, PER-5, PER-6, PER-7, PER-8, PER-9, PER-10, PER-11, PER-12, PER-13, PER-14, PER-15, PER-16, PER-17, PER-18, PER-19, PER-20, PER-21, PER-22, PER-23, PER-24, PER-25, PER-26, PER-27, PER-28, PER-29, PER-30, PER-31, PER-32, PER-33, PER-34, PER-35, PER-36, PER-37, PER-38, PER-39, PER-40, PER-41, PER-42, PER-43, PER-44, PER-45, PER-46, PER-47, PER-48, PER-49, PER-50, PER-51, PER-52, PER-53, PER-54, PER-55, PER-56, PER-57, PER-58, PER-59, PER-60, PER-61, PER-62, PER-63, PER-64, PER-65, PER-66, PER-67, PER-68, PER-69, PER-70, PER-71, PER-72, PER-73, PER-74, PER-75, PER-76, PER-77, PER-78, PER-79, PER-80, PER-81, PER-82, PER-83, PER-84, PER-85, PER-86, PER-87, PER-88, PER-89, PER-90, PER-91, PER-92, PER-93, PER-94, PER-95, PER-96, PER-97, PER-98, PER-99, PER-100
VEB	28	VEB-1, VEB-2, VEB-3, VEB-4, VEB-5, VEB-6, VEB-7, VEB-8, VEB-9, VEB-10, VEB-11, VEB-12, VEB-13, VEB-14, VEB-15, VEB-16, VEB-17, VEB-18, VEB-19, VEB-20, VEB-21, VEB-22, VEB-23, VEB-24, VEB-25, VEB-26, VEB-27, VEB-28, VEB-29, VEB-30, VEB-31, VEB-32, VEB-33, VEB-34, VEB-35, VEB-36, VEB-37, VEB-38, VEB-39, VEB-40, VEB-41, VEB-42, VEB-43, VEB-44, VEB-45, VEB-46, VEB-47, VEB-48, VEB-49, VEB-50, VEB-51, VEB-52, VEB-53, VEB-54, VEB-55, VEB-56, VEB-57, VEB-58, VEB-59, VEB-60, VEB-61, VEB-62, VEB-63, VEB-64, VEB-65, VEB-66, VEB-67, VEB-68, VEB-69, VEB-70, VEB-71, VEB-72, VEB-73, VEB-74, VEB-75, VEB-76, VEB-77, VEB-78, VEB-79, VEB-80, VEB-81, VEB-82, VEB-83, VEB-84, VEB-85, VEB-86, VEB-87, VEB-88, VEB-89, VEB-90, VEB-91, VEB-92, VEB-93, VEB-94, VEB-95, VEB-96, VEB-97, VEB-98, VEB-99, VEB-100	
ESBL	TEM	28	TEM-1, TEM-2, TEM-3
	SHV	28	SHV-1, SHV-2, SHV-3
	CTX-M	28	CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-18, CTX-M-19, CTX-M-20, CTX-M-21, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-24, CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-27, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-30, CTX-M-31, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-34, CTX-M-35, CTX-M-36, CTX-M-37, CTX-M-38, CTX-M-39, CTX-M-40, CTX-M-41, CTX-M-42, CTX-M-43, CTX-M-44, CTX-M-45, CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50, CTX-M-51, CTX-M-52, CTX-M-53, CTX-M-54, CTX-M-55, CTX-M-56, CTX-M-57, CTX-M-58, CTX-M-59, CTX-M-60, CTX-M-61, CTX-M-62, CTX-M-63, CTX-M-64, CTX-M-65, CTX-M-66, CTX-M-67, CTX-M-68, CTX-M-69, CTX-M-70, CTX-M-71, CTX-M-72, CTX-M-73, CTX-M-74, CTX-M-75, CTX-M-76, CTX-M-77, CTX-M-78, CTX-M-79, CTX-M-80, CTX-M-81, CTX-M-82, CTX-M-83, CTX-M-84, CTX-M-85, CTX-M-86, CTX-M-87, CTX-M-88, CTX-M-89, CTX-M-90, CTX-M-91, CTX-M-92, CTX-M-93, CTX-M-94, CTX-M-95, CTX-M-96, CTX-M-97, CTX-M-98, CTX-M-99, CTX-M-100
	PER	28	PER-1, PER-2, PER-3, PER-4, PER-5, PER-6, PER-7, PER-8, PER-9, PER-10, PER-11, PER-12, PER-13, PER-14, PER-15, PER-16, PER-17, PER-18, PER-19, PER-20, PER-21, PER-22, PER-23, PER-24, PER-25, PER-26, PER-27, PER-28, PER-29, PER-30, PER-31, PER-32, PER-33, PER-34, PER-35, PER-36, PER-37, PER-38, PER-39, PER-40, PER-41, PER-42, PER-43, PER-44, PER-45, PER-46, PER-47, PER-48, PER-49, PER-50, PER-51, PER-52, PER-53, PER-54, PER-55, PER-56, PER-57, PER-58, PER-59, PER-60, PER-61, PER-62, PER-63, PER-64, PER-65, PER-66, PER-67, PER-68, PER-69, PER-70, PER-71, PER-72, PER-73, PER-74, PER-75, PER-76, PER-77, PER-78, PER-79, PER-80, PER-81, PER-82, PER-83, PER-84, PER-85, PER-86, PER-87, PER-88, PER-89, PER-90, PER-91, PER-92, PER-93, PER-94, PER-95, PER-96, PER-97, PER-98, PER-99, PER-100
Carbapenemases	KPC	28	KPC-1, KPC-2, KPC-3, KPC-4, KPC-5, KPC-6, KPC-7, KPC-8, KPC-9, KPC-10, KPC-11, KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17, KPC-18, KPC-19, KPC-20, KPC-21, KPC-22, KPC-23, KPC-24, KPC-25, KPC-26, KPC-27, KPC-28, KPC-29, KPC-30, KPC-31, KPC-32, KPC-33, KPC-34, KPC-35, KPC-36, KPC-37, KPC-38, KPC-39, KPC-40, KPC-41, KPC-42, KPC-43, KPC-44, KPC-45, KPC-46, KPC-47, KPC-48, KPC-49, KPC-50, KPC-51, KPC-52, KPC-53, KPC-54, KPC-55, KPC-56, KPC-57, KPC-58, KPC-59, KPC-60, KPC-61, KPC-62, KPC-63, KPC-64, KPC-65, KPC-66, KPC-67, KPC-68, KPC-69, KPC-70, KPC-71, KPC-72, KPC-73, KPC-74, KPC-75, KPC-76, KPC-77, KPC-78, KPC-79, KPC-80, KPC-81, KPC-82, KPC-83, KPC-84, KPC-85, KPC-86, KPC-87, KPC-88, KPC-89, KPC-90, KPC-91, KPC-92, KPC-93, KPC-94, KPC-95, KPC-96, KPC-97, KPC-98, KPC-99, KPC-100
	OXA	28	OXA-1, OXA-2, OXA-3, OXA-4, OXA-5, OXA-6, OXA-7, OXA-8, OXA-9, OXA-10, OXA-11, OXA-12, OXA-13, OXA-14, OXA-15, OXA-16, OXA-17, OXA-18, OXA-19, OXA-20, OXA-21, OXA-22, OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-28, OXA-29, OXA-30, OXA-31, OXA-32, OXA-33, OXA-34, OXA-35, OXA-36, OXA-37, OXA-38, OXA-39, OXA-40, OXA-41, OXA-42, OXA-43, OXA-44, OXA-45, OXA-46, OXA-47, OXA-48, OXA-49, OXA-50, OXA-51, OXA-52, OXA-53, OXA-54, OXA-55, OXA-56, OXA-57, OXA-58, OXA-59, OXA-60, OXA-61, OXA-62, OXA-63, OXA-64, OXA-65, OXA-66, OXA-67, OXA-68, OXA-69, OXA-70, OXA-71, OXA-72, OXA-73, OXA-74, OXA-75, OXA-76, OXA-77, OXA-78, OXA-79, OXA-80, OXA-81, OXA-82, OXA-83, OXA-84, OXA-85, OXA-86, OXA-87, OXA-88, OXA-89, OXA-90, OXA-91, OXA-92, OXA-93, OXA-94, OXA-95, OXA-96, OXA-97, OXA-98, OXA-99, OXA-100
	IMP	28	IMP-1, IMP-2, IMP-3, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-7, IMP-8, IMP-9, IMP-10, IMP-11, IMP-12, IMP-13, IMP-14, IMP-15, IMP-16, IMP-17, IMP-18, IMP-19, IMP-20, IMP-21, IMP-22, IMP-23, IMP-24, IMP-25, IMP-26, IMP-27, IMP-28, IMP-29, IMP-30, IMP-31, IMP-32, IMP-33, IMP-34, IMP-35, IMP-36, IMP-37, IMP-38, IMP-39, IMP-40, IMP-41, IMP-42, IMP-43, IMP-44, IMP-45, IMP-46, IMP-47, IMP-48, IMP-49, IMP-50, IMP-51, IMP-52, IMP-53, IMP-54, IMP-55, IMP-56, IMP-57, IMP-58, IMP-59, IMP-60, IMP-61, IMP-62, IMP-63, IMP-64, IMP-65, IMP-66, IMP-67, IMP-68, IMP-69, IMP-70, IMP-71, IMP-72, IMP-73, IMP-74, IMP-75, IMP-76, IMP-77, IMP-78, IMP-79, IMP-80, IMP-81, IMP-82, IMP-83, IMP-84, IMP-85, IMP-86, IMP-87, IMP-88, IMP-89, IMP-90, IMP-91, IMP-92, IMP-93, IMP-94, IMP-95, IMP-96, IMP-97, IMP-98, IMP-99, IMP-100
	NDM	28	NDM-1, NDM-2, NDM-3, NDM-4, NDM-5, NDM-6, NDM-7, NDM-8, NDM-9, NDM-10, NDM-11, NDM-12, NDM-13, NDM-14, NDM-15, NDM-16, NDM-17, NDM-18, NDM-19, NDM-20, NDM-21, NDM-22, NDM-23, NDM-24, NDM-25, NDM-26, NDM-27, NDM-28, NDM-29, NDM-30, NDM-31, NDM-32, NDM-33, NDM-34, NDM-35, NDM-36, NDM-37, NDM-38, NDM-39, NDM-40, NDM-41, NDM-42, NDM-43, NDM-44, NDM-45, NDM-46, NDM-47, NDM-48, NDM-49, NDM-50, NDM-51, NDM-52, NDM-53, NDM-54, NDM-55, NDM-56, NDM-57, NDM-58, NDM-59, NDM-60, NDM-61, NDM-62, NDM-63, NDM-64, NDM-65, NDM-66, NDM-67, NDM-68, NDM-69, NDM-70, NDM-71, NDM-72, NDM-73, NDM-74, NDM-75, NDM-76, NDM-77, NDM-78, NDM-79, NDM-80, NDM-81, NDM-82, NDM-83, NDM-84, NDM-85, NDM-86, NDM-87, NDM-88, NDM-89, NDM-90, NDM-91, NDM-92, NDM-93, NDM-94, NDM-95, NDM-96, NDM-97, NDM-98, NDM-99, NDM-100

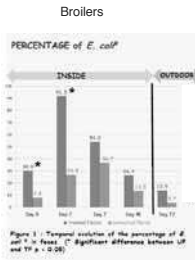


### Impact of withdrawal of in ovo use in Québec



Dutil et al.

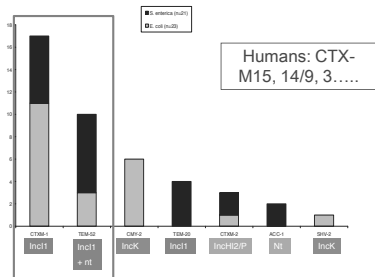
### Study on impact of ceftiofur injection in hatchery in broilers (in ovo) or layers (day-old)



->15 treated and 15 non treated flocks  
-> Collection of *E. coli* isolates from the same flock, same hatcheries  
Isolates from birds or their environment



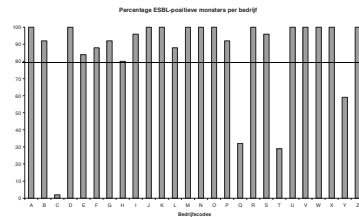
### ESBL-genes and plasmids in Broiler isolates (Dierikx et al. 2010)



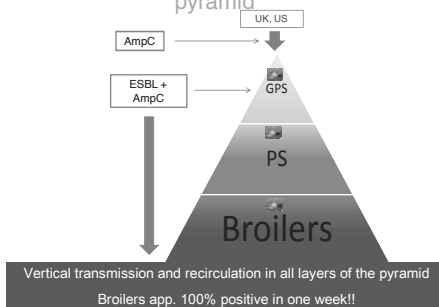
### Prevalence of ESBLs on Dutch broiler farms (Dierikx et al. NVMM)

(Dierikx et al. NVMM)

- 100 % of the farms: ESBL-positive
- On 85 % (22/26) within-farm prevalence  $\geq$  80%



### Transmission in the Poultry production pyramid



### Distribution in Europe in poultry





## Measures implemented

- **Mandatory reduction of antibiotic usage of 20% in 2012 and 50% in 2013 (compared to 2009)**
  - New target = 70%
- All antibiotic use on farms registered
  - Mandatory since 2012
- Preventive use not legal
- Independent control institute
  - Veterinary Drug Authority (SDa, [www.autoriteitdiergeneesmiddelen.nl](http://www.autoriteitdiergeneesmiddelen.nl))
    - Tasks
      - » Report usage data publically,
      - » Define target for usage
      - » Identify frequent users
      - » Control measures to improve usage

## BENCHMARKINDICATORS



### ACTION LEVEL

Direct measures necessary to reduce antibiotic usage



### SIGNALING LEVEL

Please be aware



### TARGET LEVEL

No direct measures necessary to reduce antibiotic usage



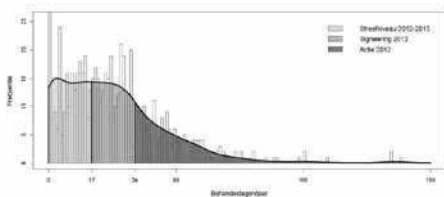
## Guidelines for therapy ([www.wvab.nl](http://www.wvab.nl))

- **Basis for treatment plans on all farms**
  - Only 1<sup>st</sup> choice drugs allowed on farms (max 1 treatment)
    - 2<sup>nd</sup> choice AB: no unless argumentation by vet
    - 3<sup>rd</sup> choice AB (cefs and FQs): no unless there is no alternative proven
- **Chicken passport**
  - Information on day-old chickens from same parents
    - Diagnostic info, antibiograms of bacterial species involved in infections etc.

## Voluntary measures by animal production sectors

- Stop usage of fluoroquinolones and cephalosporins
- Antibiotic registration systems (databases and portals) developed for cattle, pigs, poultry (also layers)
  - > 40000 farms

## Broilers usage data 2011



## Pig-production farms (top), veal calves (bottom)

Figure 16. Frequency distribution of OTC usage (total OTC) per pig production farm in 2011. The distribution fits to the exponential distribution (fitting to data via 1st moment) resulting in a long tail and an R<sup>2</sup> of 0.9195.

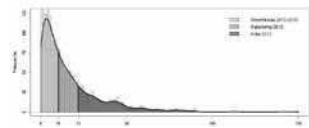
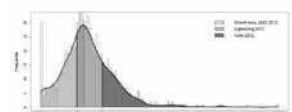
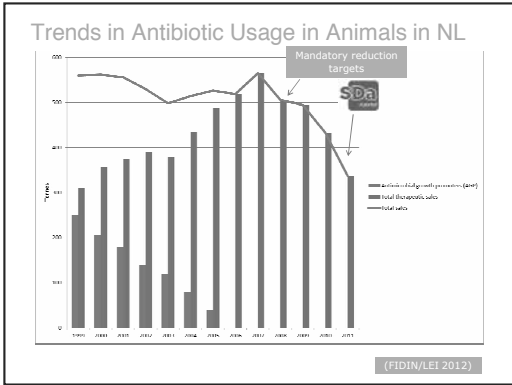


Figure 17. Frequency distribution of OTC usage (total OTC) per veal calf farm in 2011. The distribution fits to the exponential distribution (fitting to data via 1st moment) resulting in a long tail and an R<sup>2</sup> of 0.981.





### Will we succeed?

#### Antibiotic reduction

- Most likely, yes!!

- Will it be enough??

#### Antimicrobial resistance

- ??????
- Why?
  - Global problem
  - More determinants than antibiotic usage
  - May need structural changes in animal husbandry practices



**ROBERTO VILLA**

**Terapia in “continuo” o “pulsata”:  
effetti sulla farmacodinamica  
e farmacocinetica degli antibiotici**







UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

## TERAPIA IN "CONTINUO" O "PULSATA": EFFETTI SULLA FARMACODINAMICA E FARMACOCINETICA DEGLI ANTIBIOTICI

Prof. Roberto Villa



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE



## CORRETTO UTILIZZO DEGLI ANTIBATTERICI

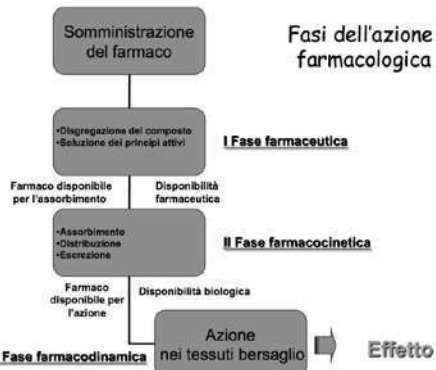
- PERMETTE DI MIGLIORARE L'EFFICACIA
- RIDURRE I COSTI
- EVITARE REAZIONI AVVERSE
- CONTENERE LA RESISTENZA
- MIGLIORARE LA SANITA' PUBBLICA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

## TEORIA E REALTÀ'

- TEORIA
  - IDENTIFICAZIONE MICRORGANISMI COINVOLTI
  - SCELTA DEL PRINCIPIO ATTIVO MIRATO
  - DOSAGGIO ADATTO A GARANTIRE EFFICACIA E ASSENZA DI EFFETTI AVVERSI TRA CUI AR
- REALTÀ' IN CAMPO
  - NECESSITÀ' D'INTERVENTO TEMPESTIVO
  - PRATICABILITÀ' DELLA SOMMINISTRAZIONE
  - COSTI SOSTENIBILI



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

## ANTIBATTERICI

- LA MAGGIOR PARTE DEI FARMACI ANTIBATTERICI UTILIZZATI IN CAMPO VETERINARIO VENGONO DALLA MEDICINA UMANA
- UNO DEI FATTORI RILEVANTI NELLO SVILUPPO DELLA RESISTENZA E' IL DOSAGGIO NON CORRETTO
- LE DIFFERENZE SPECIE-SPECIFICHE INFLUENZANO LA CINETICA DEL FARMACO
- LA DINAMICA DIPENDE DAL MICRORGANISMO COINVOLTO E DALLA SEDE D'INFEZIONE
- IN CAMPO VETERINARIO ESISTE UNA DISCRETA CONOSCENZA IN MERITO AL COMPORTAMENTO CINETICO SPECIE-SPECIFICO, MENTRE ANCORA SCARSI SONO GLI STUDI CHE METTONO IN CORRELAZIONE CINETICA E DINAMICA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

## RESISTENZA BATTERICA

- 25000 MORTI ALL'ANNO IN EUROPA - NON SONO UNA PANDEMIA, MA...
- L'UNIONE EUROPEA IMPONE IN MEDICINA UMANA E VETERINARIA UN USO PRUDENTE DEGLI ANTIBATTERICI
- E' PREVEDIBILE UNA RESTRIZIONE D'USO DEGLI ANTIBATTERICI IN CAMPO ZOOTECNICO
- OGNI SFORZO POSSIBILE PER CERCARE DI MIGLIORARE L'UTILIZZO DEGLI ANTIBATTERICI E' DOVEROSO DA UN PUNTO DI VISTA SANITARIO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

# FARMACOCINETICA E FARMACODINAMICA

## FARMACOCINETICA

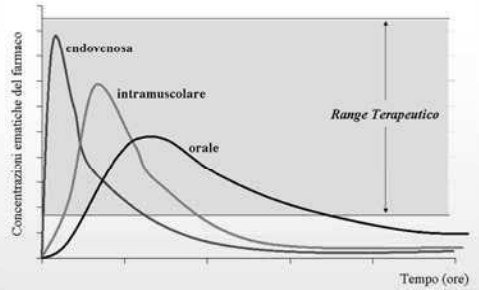
- ASSORBIMENTO
- DISTRIBUZIONE
- METABOLISMO
- ELIMINAZIONE



## FARMACODINAMICA

- MIC
- ALTRO

Figura 1. Confronto dei livelli ematici di un farmaco somministrato, alla stessa dose, per tre vie diverse



**RANGE TERAPEUTICO**  
L'intervallo di concentrazioni ematiche di un farmaco entro il quale si manifestano normalmente gli effetti terapeutici senza effetti tossici dose-dipendenti

**CONCENTRAZIONE MINIMA TOSSICA**  
La concentrazione ematica di un farmaco al di sopra della quale compaiono gli effetti tossici dose-dipendenti. Corrisponde al limite superiore del range terapeutico

**CONCENTRAZIONE MINIMA TERAPEUTICA**  
La concentrazione ematica di un farmaco al di sotto della quale non si hanno effetti terapeutici. Corrisponde al limite inferiore del range terapeutico.

### CINETICA - DIFFERENZE DI SPECIE

**Farmaco** → **Effetto ottimale** ← **Dinamica**

**Cinetica** → **Effetto ottimale** ← **PK-PD**

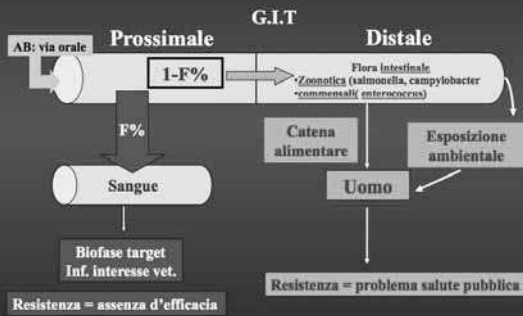
**Fattori legati al farmaco:** Solubilità, Permeabilità, Formulazione, Eccipienti, Patibilità

**Fattori legati alla specie:** Anatomia GI, Tempo di transito GI, Volume secretori GI, pH secreti, Sali biliari, Permeabilità intestinale, Metabolismo, Legame proteico, Eliminazione

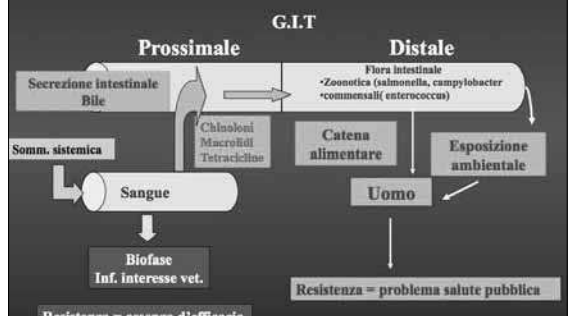
**Fattori legati alla dinamica:** Popolazione recettoriale, Esone, Affinità, Potenza

**USO IN DEROGA ?**

## BIOFASE E ANTIBIOTICORESISTENZA



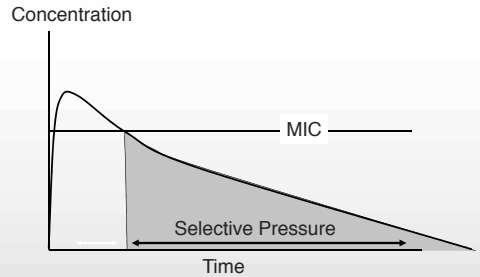
## BIOFASE E ANTIBIOTICORESISTENZA



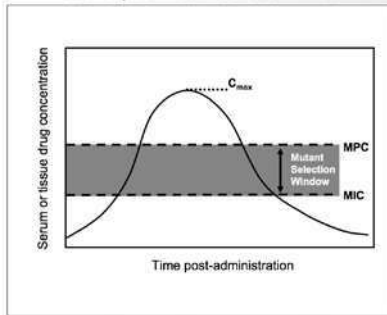
## ANTIBATTERICI

- SONO NORMALMENTE FARMACI DOTATI DI UNA BUONA MANEGGEVOLEZZA
- MOLTI FARMACI ANTIBATTERICI SONO DI USO CONSOLIDATO DA MOLTI DECENNI
- LA DEFINIZIONE DEI DOSAGGI E' STATA DERIVATA DA STUDI IN MEDICINA UMANA E POI DA SEMPLICI VALUTAZIONI FARMACOCINETICHE CONFRONTATE CON DATI DI ATTIVITA' IN VITRO (MIC)

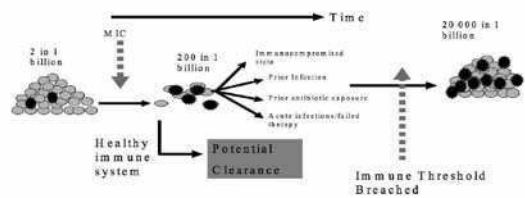
## Pressione selettiva ceppi resistenti in termini cinetici



## The concept of Mutant Selection Window



MPC = The Mutant Prevention Concentration



Bacterial populations may contain resistant cells which may become selectively enriched during antibiotic therapies if MPCs are not targeted during dosing. Two-step minimum moments (dark colored stars) are present in bacterial cultures oscillating between 10<sup>10</sup> and 10<sup>11</sup> CFU/ml. Increasing levels of resistance, concentration/duration, and immunocompromised hosts place heavy reliance on the antimicrobial to control bacterial growth. Under these conditions resistant cells are selectively enriched during successive rounds of dosing. Eventually, the number of mutant cells may become high enough that mutant subpopulations become a consistent fraction of the bacterial population. If the selection has progressed to the point where the antimicrobial is incapable of directly controlling the bacterial growth then clinical failures and potential spread of resistant organisms may occur.

## Obiettivi degli indici PK/PD

Gli obiettivi degli indici PK/PD sono di prevedere, *in vivo*, il risultato clinico per:

- Cura
- Prevenzione della resistenza

## C<sub>max</sub> / MIC Rapporto di inibizione (inhibitory ratio)

$$IR = \frac{C_{max}}{MIC_{90}} \quad PD$$

PK allo steady state

- **Disponibilità (%)**
- **Clearance**
- **Assorbimento**
- **Eliminazione (clearance, VD)**
- **Fattore di accumulo per somministrazioni ripetute (emivita)**

- Buona previsione della risposta clinica per AB concentrazione dipendenti
- Un elevato C<sub>max</sub>/MIC evita le resistenze
- Il "migliore" indice per gli **aminoglicosidi**

$T > MIC$

Tempo durante il quale le concentrazioni superano la MIC

Applicazione:  
Betalattamine

- $T > MIC$  tra  $t_2 - t_1$
- **determinazione PK: complessa**  
– clearance, half-life
- Data come **percentuale dell'intervallo di dosaggio allo steady state**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DEPARTAMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SANITÀ, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA BIOTECNOLOGIA

AUC : AUC parziale per il tempo in cui le concentrazioni plasmatiche sono superiori alla MIC

- $AUC = AUC_{(t1-t2)} / MIC$
- Unità = tempo (h)
- Stabilito per un periodo di 24 h (in condizioni di steady state)

Applicazione:  
Fluoroquinoloni

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DEPARTAMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SANITÀ, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA BIOTECNOLOGIA

**PK/PD indicatori di efficacia**

- $T > MIC$  : penicilline, cefalosporine, macrolidi, oxazolidinoni
- $C_{max}/MIC$  : aminoglicosidi
- AUC (o 24h AUC/MIC) : chinoloni, tetracicline, ketolidi, azitromicine, streptogramine

$AUC = \frac{AUC}{MIC}$

Unità = Tempo (h)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DEPARTAMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SANITÀ, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA BIOTECNOLOGIA

**I tre indici PK/PD**

Antibiotico	PK/PD indice	Obiettivo	Valore critico
$\beta$ -Lattamine	Tempo $> MIC$	Massimizzare il tempo di esposizione	50-100% intervallo di dosaggio
Chinoloni	24h AUC/MIC	Ottimizzare la quantità di AB somministrata	125 h
Aminoglicosidi	$C_{max}/MIC$	Ottimizzare la concentrazione picco	10

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DEPARTAMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SANITÀ, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA BIOTECNOLOGIA

**Quali valori numerici per gli indici PK/PD?**

1. Per ottimizzare l'efficacia
2. Per minimizzare la resistenza

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DEPARTAMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SANITÀ, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA BIOTECNOLOGIA

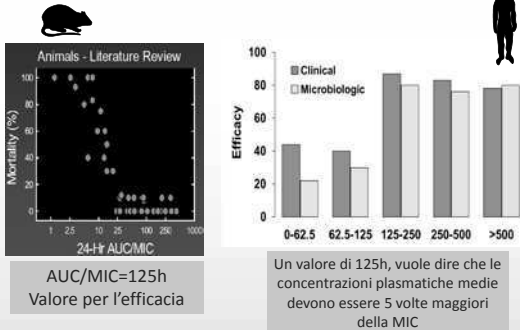
**Valori degli indici PK/PD :Gli aminoglicosidi**

Relazione tra il rapporto del picco delle concentrazioni plasmatiche sulla MIC e la probabilità di guarigione di 236 pazienti con una infezione da Gram- trattata con un aminoglicoside (gentamicina, tobramicina, amikacina)

Moor et al. 1984 J. Infect. Dis.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DEPARTAMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SANITÀ, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA BIOTECNOLOGIA

## Valori degli indici PK/PD :I chinoloni



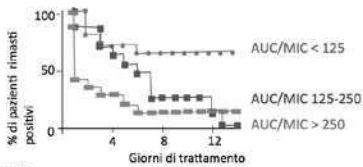
## Quali valori numerici per gli indici PK/PD?

1. Per ottimizzare l'efficacia
2. Per minimizzare la resistenza

## AUC/MIC ed eradicazione batterica

Polmonite nosocomiale trattata EV con ciprofloxacina  
AUC/MIC è un buon indice per prevedere il tempo di eradicazione batterica

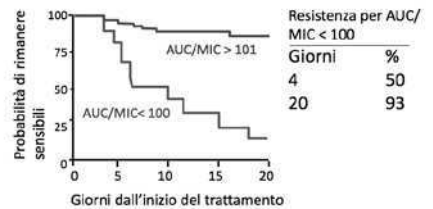
- Se AUC/MIC >250 h/giorno:  
• Eradicazione in 24h



Schentag Symposium, 1999

## AUC/MIC e sviluppo di resistenza

Valore predittivo di AUC/MIC per ciprofloxacina nelle polmoniti nosocomiali



AUC/MIC < 100 = subottimale

## Quali sono le concentrazioni per prevenire la selezione di batteri a sensibilità ridotta?

- Beta-lattamici:
  - Rimanere sempre al di sopra di 4xMIC
  - ma 40-60% del T>MIC per efficacia
- Aminoglicosidi:
  - Ottenere almeno un picco di 8xMIC
- Fluorochinoloni:
  - AUC/MIC > 125 e C<sub>max</sub> / MIC > 8

## Pharmacodynamic (PD) parameters correlating with efficacy

Antibacterial class	Optimal PD parameter	PK/PD magnitude required for efficacy
Aminoglycosides	C <sub>max</sub> /MIC	10-12
Fluoroquinolones	AUC/MIC	>25 <sup>a</sup> ; >100 <sup>b</sup>
β-Lactams	T > MIC	>50 <sup>a</sup> ; >70 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mild infection (immunocompetent host).

<sup>b</sup> Severe infection and immunocompromised host.

## EMA »Punti da considerare «

- Il dosaggio inadeguato degli antibiotici è probabilmente una delle principali fattori di rischio per la resistenza
- L'indicazione di dosaggi specifici per le differenti infezioni potrebbe essere un punto importante nella lotta all'antibiotico resistenza
- La possibilità di dare tali indicazioni sulla base della valutazione PK-PD e oggi una possibilità concreta e valutata dagli organismi scientifici

## QUALI STRATEGIE

- ANTIBIOGRAMMI
- MIC AGGIORNATE (MPC ??)
- FARMACOVIGILANZA
- LIMITARE E VIGILARE L'USO IN DEROGA
- VALUTAZIONI CINETICHE IN ANIMALI INFETTI
- DATI EPIDEMIOLOGICI
- DEFINIZIONE DEI BREAKPOINT

**PETRA CAGNARDI**

**Terapia in continuo o pulsata:  
approccio PK/PD nella somministrazione  
orale di fluorochinoloni nel tacchino**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

**TERAPIA IN CONTINUO O PULSATA:  
APPROCCIO PK/PD NELLA  
SOMMINISTRAZIONE ORALE DI  
FLUOROCHINOLONI NEL TACCHINO**

**P. Cagnardi**  
Programma di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale  
"Uso prudente di fluorochinoloni nel tacchino: farmacocinetica di enrofloxacin, difloxacin e flumechina per l'applicazione di modelli PK/PD"

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
PER LA SALUTE, LA PRODUZIONE ANIMALE  
E LA SICUREZZA ALIMENTARE

### Fluorochinoloni nelle specie aviari

- **Vantaggi:**
  - Possibilità di somministrazione orale
  - Assorbimento rapido a livello gastroenterico, emivita di eliminazione lunga (effetto post-antibiotico significativo), elevata distribuzione nell'organismo
  - Elevata potenza contro batteri Gram -
  - Bassa tossicità (ampio margine di sicurezza)
- **Svantaggi:**
  - Se a dosi inappropriate favoriscono lo sviluppo di resistenza batterica


### Fluorochinoloni

- **Flumechina:**
  - fluorochinolone di 1ª generazione usato in molte specie da reddito per controllare infezioni causate da batteri Gram -, sottogruppo *Enterobacteriaceae*; *Escherichia coli* - *Klebsiella* spp. - *Proteus* spp. - *Enterobacter* spp. - *Salmonella* spp. - *Shigella* spp.
  - Buona efficacia, tollerabilità e bassi costi
  - Nelle specie aviarie usato per terapie di massa
- **Enrofloxacin:**
  - fluorochinolone di 2ª generazione a spettro ampliato, usato in molte specie da compagnia e da reddito per controllare infezioni causate da batteri Gram -.
  - Buona efficacia e tollerabilità
  - Nelle specie aviarie usato per terapie individuali e di massa

### Tipi di terapia in allevamento aviare

- **Terapia individuale:** uso prudente del farmaco antimicrobico che limita lo sviluppo di resistenze e permette una terapia mirata
  - Limitata ad animali di pregio e riproduttori
- **Terapia di massa** tramite acqua o mangime medicato è una pratica comune
  - In continuo durante tutto il periodo di luce
  - Pulsata per un periodo di tempo tra 4h e 10-12 h

### Studio sperimentale

32 tacchini ♀ divisi in 4 gruppi 

- **Gruppo 1:** peso  $3.84 \pm 0.26$  kg, età 62 gg; Enrofloxacin bolo orale 10 mg/kg
- **Gruppo 2:** peso  $7.12 \pm 0.67$  kg, età 56 gg; Enrofloxacin pulsata 10 h a 10 mg/kg x 5 g
- **Gruppo 3:** peso  $3.84 \pm 0.24$  kg, età 63 gg Flumechina bolo orale 15 mg/kg
- **Gruppo 4:** peso  $5.79 \pm 0.26$  kg, età 79 gg Flumechina pulsata 10 h a 15 mg/kg x 5 g

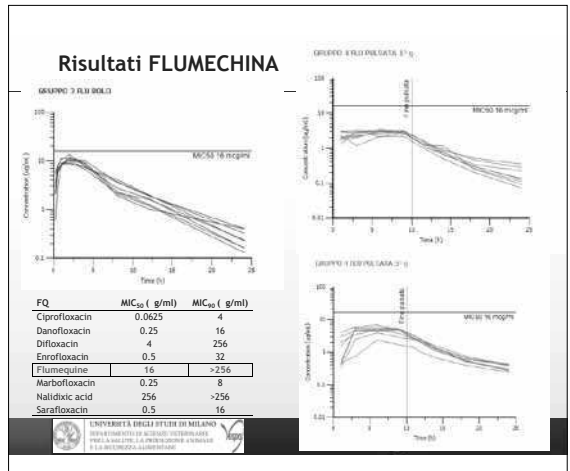
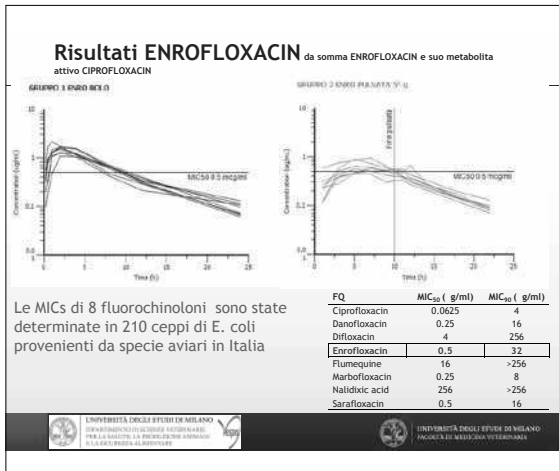
### Studio sperimentale

**PRELIEVI:**

- Gruppo 1 e 3 bolo: a 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h
- Gruppo 2 ENRO pulsata: a 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 18 e 22 h il 5° g di trattamento
- Gruppo 4 FLU pulsata: a 0, 1, 3, 6, 9, 11, 12, 14, 18 e 24 il 1° e 5° g di trattamento



Quantificazione campioni tramite metodo validato LC/MS/MS  
Analisi cinetica non-compartmentale



### Risultati cinetici

Parametro (unità)	Gruppo 1 ENRO Bolo	Gruppo 2 ENRO Pulsata 5* g	Gruppo 3 FLU Bolo	Gruppo 4 FLU Pulsata 1* g	Gruppo 4 FLU Pulsata 5* g
C <sub>max</sub> (g/ml)	1.53 ± 0.31*	0.67 ± 0.18*	10.76 ± 1.5*	3.05 ± 0.36*	4.01 ± 1.3*
T <sub>max</sub> (h)	1.88 ± 0.33*	6.86 ± 2.48*	1.88 ± 0.35*	5.75 ± 2.71*	6 ± 1.6*
AUC <sub>0-24</sub> (hr.µg/ml)	12.74 ± 1.52*	7.37 ± 1.07*	76.14 ± 7.69*	33.46 ± 4.65*	51.54 ± 14.87*
T <sub>1/2</sub> elim (h)	6.58 ± 1.82	5.31 ± 0.63	4.77 ± 1.48*	5.31 ± 1.72	6.39 ± 1.18*

\*P<0.05 differenza significativa tra bolo e pulsata; † P<0.05 differenza significativa tra pulsata giorno 1 e 5

- ### Approccio PK/PD
- Efficacia fluorochinoloni determinata principalmente da AUC/MIC<sub>50</sub>, ma anche da C<sub>max</sub>/MIC<sub>50</sub>
  - Valori soglia (*breakpoint*) determinati in umana sono AUC/MIC<sub>50</sub> = 125 e C<sub>max</sub>/MIC<sub>50</sub> > 10
  - Nessun *breakpoint* per specie veterinarie e colibacillosi, ma valori considerati minimi per prevenire l'antibiotico resistenza sono: AUC/MIC<sub>50</sub> pari a 100 e C<sub>max</sub>/MIC<sub>50</sub> pari a 8-10

### Risultati PK/PD

Parametro	Gruppo 1 ENRO Bolo	Gruppo 2 ENRO Pulsata 5* g	Gruppo 3 FLU Bolo	Gruppo 4 FLU Pulsata 1* g	Gruppo 4 FLU Pulsata 5* g
C <sub>max</sub> /MIC <sub>50</sub>	3.07 ± 0.62	1.35 ± 0.37	0.67 ± 0.09	0.19 ± 0.02	0.3 ± 0.08
AUC <sub>0-24</sub> /MIC <sub>50</sub>	25.48 ± 3.04	15.31 ± 2.92	4.76 ± 0.48	2.09 ± 0.29	3.22 ± 0.93
C <sub>max</sub> /MIC <sub>50</sub>	6.14 ± 1.32	2.69 ± 0.74			
AUC <sub>0-24</sub> /MIC <sub>50</sub>	50.97 ± 6.5	30.63 ± 5.84			

FQ	MIC <sub>50</sub> (g/ml)	MIC <sub>90</sub> (g/ml)
Enrofloxacina	0.5	32
Enrofloxacina NCCLS	0.25	
Flumequine	16	>256

- ### Conclusioni
- Rivalutazione dei protocolli terapeutici per ottimizzare l'efficacia e limitare lo sviluppo di resistenze
  - Dosaggi e tipologia di somministrazione
  - Attenzione al calcolo dei tempi di sospensione





**CLARA MONTESISSA**  
**Approcci legislativi**  
**per la tutela dell'ambiente**



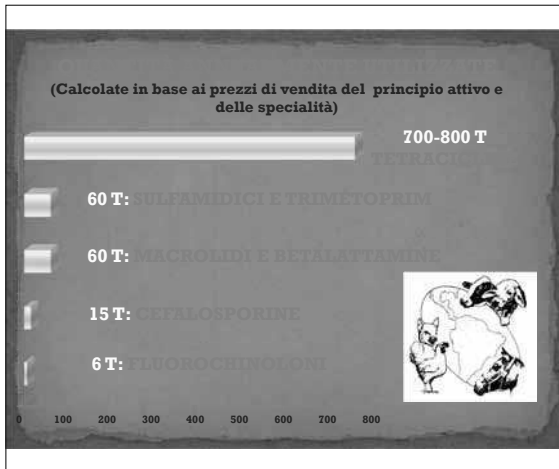
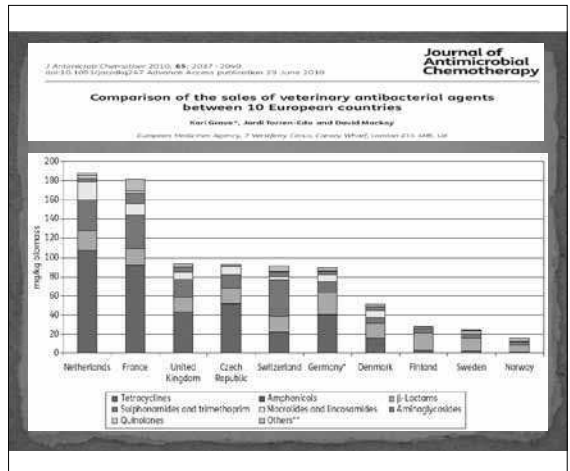
## ANTIMICROBICI E ECOTOSSITÀ

### APPROCCI LEGISLATIVI PER LA TUTELA DELL'AMBIENTE

Congresso 51° SIPA  
Salsomaggiore 12. 10. 2012

Clara Montesissa

Dipartimento di Biomedicina comparata e Alimentazione  
Università degli studi di Padova

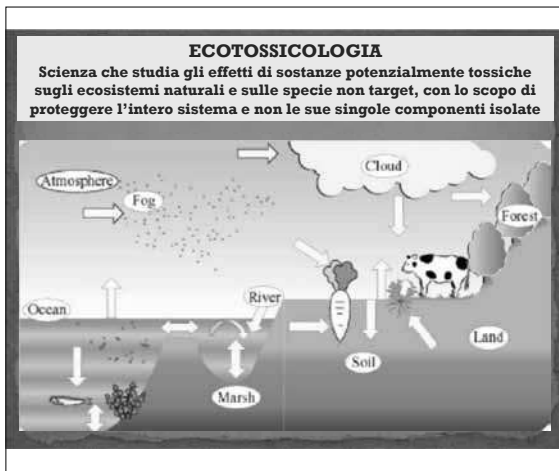


**FLUORO-CHINOLONI**      pressione antibiotico selettiva alle condizioni di impiego in allevamento >> ceppi patogeni resistenti diffusione per sistemi di macellazione e lavorazione ecc. (i.e: pollo)

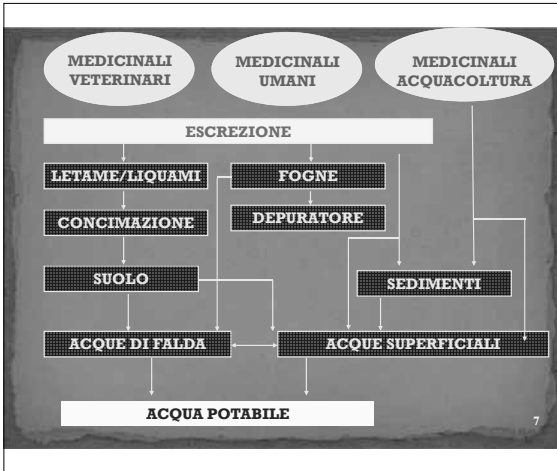
**CEFALOSPORINE B-LATTAMINE**      possibilità di residui con sensibilizzazione e allergie nel consumatore

**MACROLIDI**      possibile ecotossicità per contaminazione ambientale (degradabilità) del farmaco,

**SULFAMIDICI TRIMETOPRIM TETRACICLINE**      alterazione biota batterico terreno, inattivazione biodepurazione degradazione dei reflui alterata e contaminazione delle acque superficiali

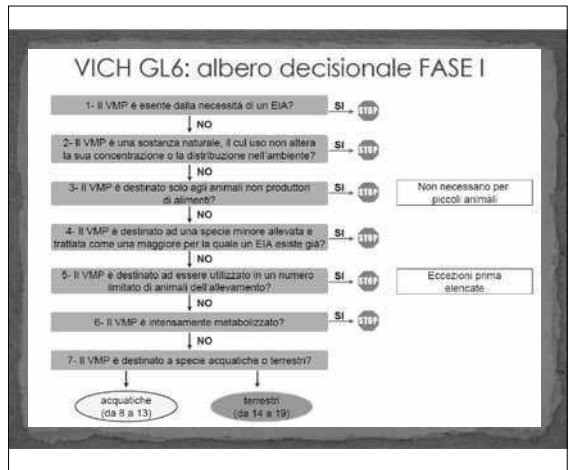
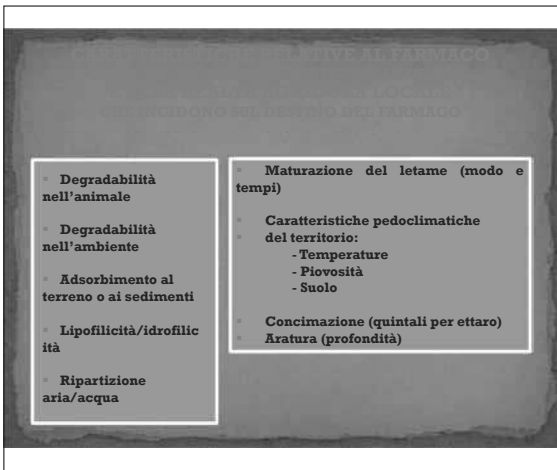
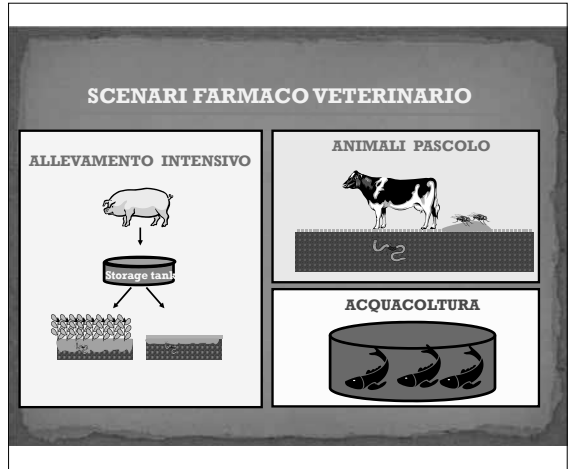
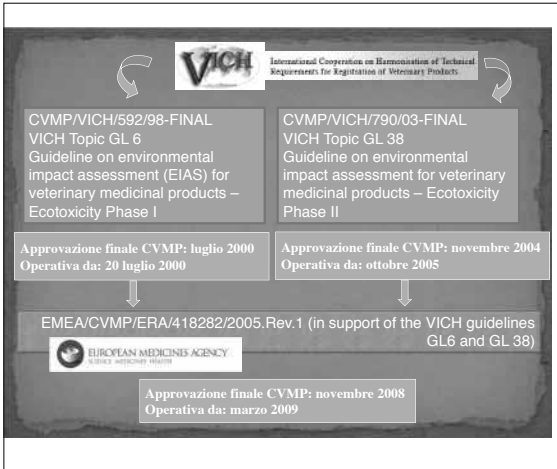






Environmental risk assessment  
Linee guida EMA/CVMP

Titolo	Documenti	Referenze	Publication date	Effective date	Stato
Risk mitigation measures related to the environmental risk assessment of veterinary medicinal products	<ul style="list-style-type: none"> <li>Overview of guidance</li> <li>Accepted reflection paper</li> <li>Draft reflection paper</li> </ul>	EMA/CVMP/08 AMB/0302/02	March 2013		
Testing strategy and risk assessment for plants	<ul style="list-style-type: none"> <li>Overview of guidance</li> <li>Accepted reflection paper</li> <li>Draft reflection paper</li> </ul>	EMA/CVMP/08 A13/04/01	Dec 2011	1 Jan 2012	
Assessment of persistence, bioaccumulative and toxic (PBT) or very persistent and very bioaccumulative (VTV) substances in veterinary medicine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Draft guideline</li> <li>Concept paper</li> </ul>	EMA/CVMP/08 A12/04/02	Release for consultation		Deadline for comments 1 Feb 2013
Determining the fate of veterinary medicinal products in manure	<ul style="list-style-type: none"> <li>Overview of guidance</li> <li>Accepted guideline</li> <li>Draft guideline</li> </ul>	EMA/CVMP/08 A14/03/06	Mar 2011		
Higher tier testing of impurities to drug impurities	<ul style="list-style-type: none"> <li>Concept paper</li> </ul>	CVMP/08A132 :S4/2008	Release for consultation	Dec 2008	Deadline for comments 30 Nov 2009
Veterinary medicinal products in manure	<ul style="list-style-type: none"> <li>Concept paper</li> </ul>	CVMP/08A130 :K3/2008	Release for consultation	Feb 2008	Deadline for comments 30 April 2009
VICH GL6: Environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products - Phase I	<ul style="list-style-type: none"> <li>Accepted guideline</li> </ul>	CVMP/VICH/09 3/1998	Jul 2006	Jul 2006	
VICH GL8: Environmental impact assessment for veterinary medicinal products (EIMP) - Phase II	<ul style="list-style-type: none"> <li>Accepted guideline</li> </ul>	CVMP/VICH/09 6/2009	Jan 2005	Jul 2005	
Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products in Support of the VICH Guidelines GL6 and GL8	<ul style="list-style-type: none"> <li>Overview of guidance</li> <li>Accepted guideline</li> <li>Draft guideline</li> </ul>	EMA/CVMP/09 A14/14/02/02	Nov 2008	Mar 2009	<ul style="list-style-type: none"> <li>Summary of meeting held 23/10/08</li> <li>Comments and Actions [View]</li> </ul>





### CALCOLO DELLA PEC NEL TERRENO

$$\left( \frac{DxAdxBWxPxl70xH}{1500x10000x0.05xNyxH} \right) x1000$$

Dosaggio massimo raccomandato per Marbofloxacina soluzione iniettabile 10%

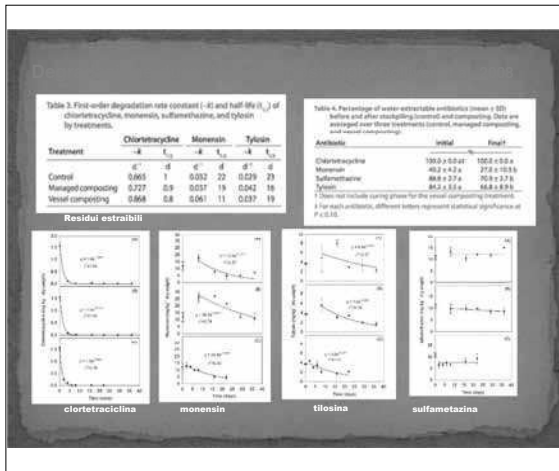
Specie animale	Dose (D)	Giorni di trattamento (Ad)
Bovini	2 mg/kg p.v.	5 giorni
Suini		3 giorni

PEC nel terreno

Categoria animale	PEC <sub>max</sub>
Bovini	
Calf	28.56 µg/kg
Dairy cow	14.04 µg/kg
Calf 0-1 year	26.19 µg/kg
Calf 1-2 years	29.14 µg/kg
Weaner pig	24.07 µg/kg
Suini	
Fattening pig	17.68 µg/kg
Sow (with litter)	4.28 µg/kg

STOP

100 µg/kg = valore che ha dimostrato di non produrre effetti in studi di ecotossicità con i VMP attualmente registrati in USA

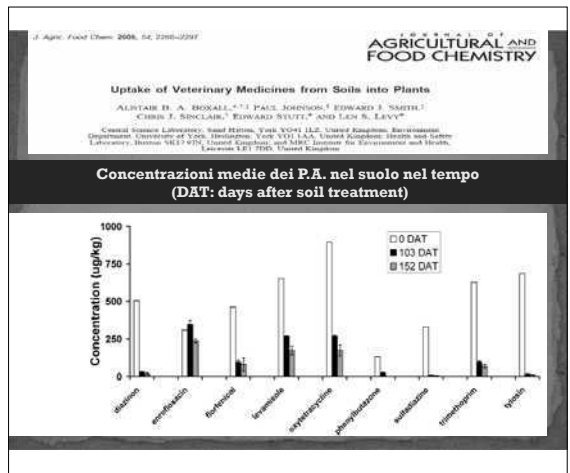
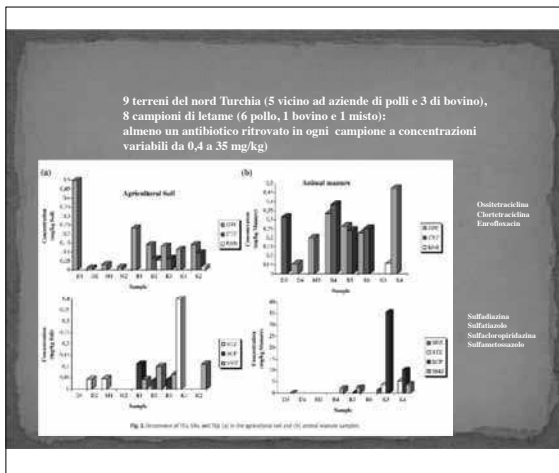


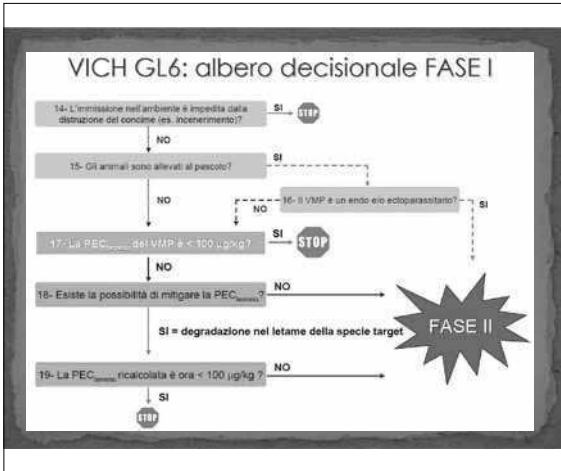
### Degradazione ossitetraciclina in letame di bovino

- 50 bovini trattati con 60 mg/kg/giorno di OTC per 5 gg
- Prelevi:
  - Letiera (da punti diversi del pavimento) e feci (10 animali random) a 10
  - Altri campioni:
    - a 1 giorno dalla fine del trattamento
    - a 10 gg dalla fine del trattamento prima della raccolta e sostituzione lettiera
    - a 30 - 45 - 60 - 75 - 105 - 135 gg dalla fine del trattamento, durante la maturazione del letame
- Eventuale valutazione passaggio nel suolo (prelevi di terreno dopo dispersione del letame e aratura) e nell'acqua

USE OF OXYTETRACYCLINE AND TYLOSIN IN INTENSIVE CATTLE FARMING: EVALUATION OF TRANSFER TO MANURE AND SOIL

MARCO DE LIGNIS<sup>1,2</sup>, SPINICO CHIA<sup>1</sup>, FRANCESCO COPPINI<sup>1</sup>, DOTT. HALLING-SERVA<sup>3</sup>, CLARA MONTANARI<sup>1</sup>





### Tossicità sulle piante

- La pianta può assorbire (uptake) il farmaco disperso sul terreno arato
- L'uptake di tali sostanze può influenzare la crescita o lo sviluppo della pianta. Dipende da:
  - Tipo di pianta
  - Tipo di molecola
  - Dose
  - Cinetica di adsorbimento/deadsorbimento
  - Mobilità nel terreno

**BIOACCUMULO** in foglie, radici e germogli

- Fattore di rischio significativo per la salute?
- Fattore di rischio per la pianta (effetto negativo sulla crescita)

### Tossicità sulle piante

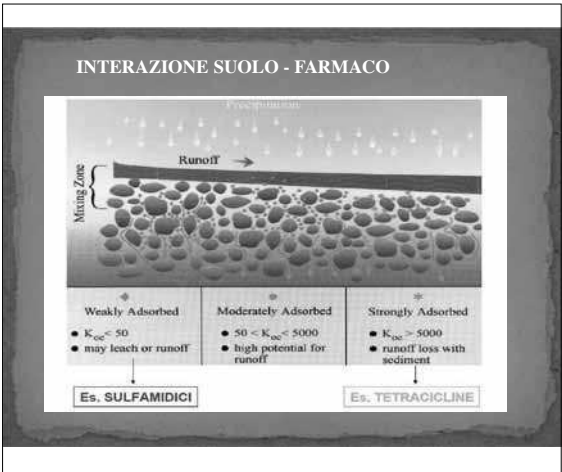
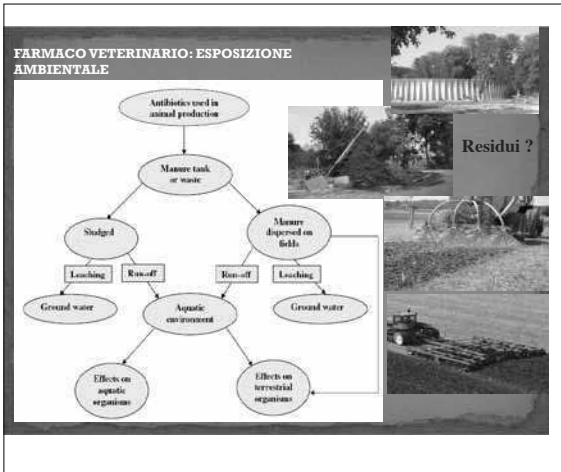
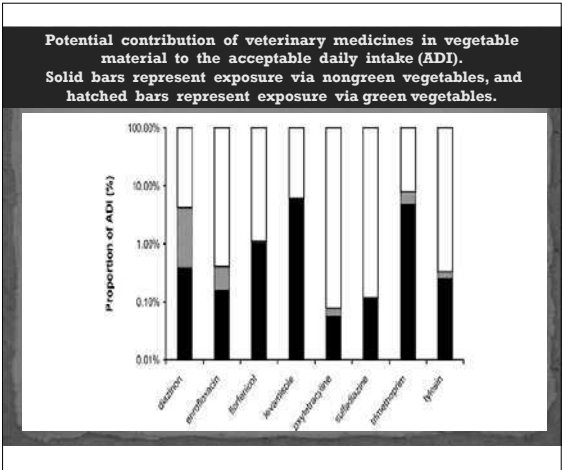
Ph. Zedda *Agricoltura, Ambiente and Environment* 43 (2002) 247-278

Table 1  
Some of the therapeutic compounds reported to be phytotoxic under laboratory conditions

Compound	Type of vegetation	Matrix	Concentration	Reference
Chloramphenicol	<i>Plantago virginica</i> L.	Liquid and soil	10 and 100 µg/ml	Sancheider (1983, 1982)
Chloramphenicol	<i>Trifolium pratense</i> L.	Soil	80 mg/l <sup>2</sup>	Zedda (in press)
Streptozocin	<i>Malva sylvestris</i> L.	Water	30-100 µg/l <sup>1</sup>	Mare et al. (1992)
Streptomycin	Agave ( <i>Chlorophytum</i> sp.)	Water	80 µg <sup>1</sup> of 1.1 mg/l <sup>1</sup>	Landy and Stillep: <i>Phytochem</i> (1992)
Oxytetracycline	<i>Nerium oleander</i> (L.) Vent.	Soil	3.1 mg g <sup>-1</sup>	Sanchez (in press)
	<i>Plantago virginica</i> L.	Liquid and soil	10 and 100 µg/ml	Sancheider (1983, 1982)
Quinoxaline	<i>Nerium oleander</i> (L.) Vent.	Soil	10.4 mg g <sup>-1</sup>	Zedda (in press)
Tetracycline	<i>Rumex crispus</i> L.	Liquid and soil	40 µg/ml	Becker et al. (1990)
Tetracycline	<i>Asperula cynosuroides</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1997)
	<i>Plantago major</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1997)
	<i>Amaranthus spinosus</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1997)
	<i>Rumex acetosella</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1997)
Tetracycline	<i>Agave americana</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1999)
	<i>Plantago major</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1999)
	<i>Agave americana</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1999)
Tetracycline	<i>Asperula cynosuroides</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1998)
	<i>Plantago major</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1998)
Fluoroquinolones	<i>Amaranthus spinosus</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (1998)
	<i>Rubus idaeus</i>	Exp. field	300 mg l <sup>-1</sup> in 1 µg l <sup>-1</sup> soil	Magliana et al. (1998)
Fluoroquinolones	<i>Erigeron strigosus</i>	Agar	300 mg l <sup>-1</sup>	Magliana et al. (2000)

<sup>1</sup>EC<sub>50</sub> is the effective concentration of the compound that causes toxicity to 50% of the test population.  
<sup>2</sup>Phytotoxic action was observed in a mixture containing 400 ppm oxytetracycline, gentamicin and data given as soil (Zedda et al., 2000).

"Field data about the concentrations of pharmaceutical compounds in soil is not readily available but in most cases, the in vitro studies seem to have been conducted at concentrations that are unlikely to occur in soil"



**Organismi Terrestri**

**PRINCIPIO ATTIVO MISCELATO AL TERRENO SABBIOSO O ARGILLOSO O AL MANGIME**

**PARAMETRI FONDAMENTALI PER OGNI MOLECOLA**  
 PEC, PM, pK, semivita deiezioni,  
 $K_{OW}$ ,  $K_{OC}$ , affinità carbonio organico, semivita

microorganismi (batteri nitrificanti)  
 Produttori piante foraggere, mais, orzo, trifoglio,  
 Consumatori primari lombrichi, quaglie, anatre, conigli,  
 Decompositori larve di insetti, coprofagi, mosche, stercorari


25

**Organismi Acquatici**

**PRINCIPIO ATTIVO DISCIOLTO NELL'ACQUA A DIVERSE CONCENTRAZIONI**


**EC<sub>50</sub>**  
a 48h o a 96h

crostacei copepodi  
*Dafnia magna*  
*Artemia salina*



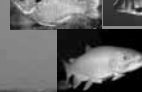
**EC<sub>50</sub> oppure**  
test di fotoperiodicità

alghe unicellulari (acque dolci)  
*Chlorella pyrenoidosa*  
*Selenastrum capricornutum*



**LC<sub>10</sub>**

pesci persico sole (*Lepomis macrochirus*)  
trota (*Oncorhynchus mykiss*)  
Carpa (*Cyprinus carpio*)



26


**CONCENTRAZIONI SENSIBILI PER**

**✓ TERRESTRI**

- ✓ Vermi di terra \*
- ✓ Attività batterica (mineralizzazione di N e C)\*
- ✓ Artropodi \* (solo se attività insetticida)
- ✓ Piante \*
- ✓ Ditteri e coleotteri del letame \*\*\*

**✓ ACQUATICI**

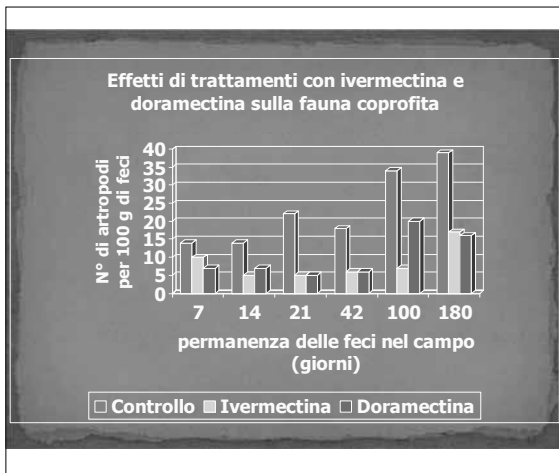
- ✓ Dafnidi \*\*
- ✓ Alghe \*\*
- ✓ Pesci \*\*



Se valore soglia della PEC superato  
 nel suolo (concimato)  
 nelle acque  
 nelle feci (solo animali al pascolo)

**CONCENTRAZIONI SENSIBILI PER**

Farmaco	Modello	Concentrazione (EC50 o LC50)	Effetto
Tilosina	Alghe	0,95 mg/L	Inibizione Crescita
Ivermectina	Vermi	15,8 mg/kg	Mortalità
Bacitracina	Crostacei	34 mg/L	Mortalità
Ossitetraciclina	Piante	160 mg/kg	Mortalità
Clortetraciclina	Batteri	0,028 mg/L	Inibizione crescita



**Tossicità acquatica di due sulfamidici con 5 organismi test sensibili** De Liguoro et al. 2010

Sulfachinossalina (SQO) e Sulfaganidina (SGD)

**Table 3**  
Daphnia magna reproduction tests with SQO and SGD: nominal rate, average daily growth and offspring production.

Nominal concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Survival rate (%)	Average daily growth length (mm/d)	Total number of neonates	Neonates per female (mean ± SD)
SQO				
0.25	90	146.6 ± 11.4*	326	36.22 ± 5.48*
1.125	80	147.2 ± 11.8*	763	76.30 ± 14.65*
1.562	90	148.0 ± 9.8	888	98.78 ± 18.27
0.191	90	151.9 ± 9.2	1211	121.3 ± 21.29
0.395	70	155.9 ± 8.0	877	122.29 ± 28.11
Control	90	150.0 ± 7.4	1195	132.78 ± 34.87

**Table 4**  
NOEC, LOEC and EC<sub>50</sub> of SQO and SGD measured on the five test organisms.

	NOEC	LOEC	EC <sub>50</sub> (95% C.L.)	EC <sub>10</sub> (95% C.L.)
<b>SQO</b>				
<i>D. magna</i>	0.781	1.563	3.239 (3.114-3.316)	3.466 (2.642-4.469)
<i>P. subcapitata</i>	0.039	0.078	0.059 (0.039-0.091)	0.246 (0.179-0.355)
<i>S. dimorpha</i>	0.020	0.039	0.030 (0.018-0.104)	0.451 (0.414-0.491)
<i>S. immobilis</i>	0.078	0.156	0.100 (0.090-0.120)	2.834 (2.599-3.178)
<i>L. gibbus</i>	2.5	5	2.281 (1.558-3.691)	11.551 (8.250-25.616)
<b>SGD</b>				
<i>D. magna</i>	0.395	0.781	0.3217 (0.332-0.599)	0.669 (0.630-1.007)
<i>P. subcapitata</i>	20	40	22.415 (26.446-29.380)	41.559 (38.225-48.373)
<i>S. dimorpha</i>	1.25	2.5	1.656 (0.780-1.980)	3.400 (3.134-3.673)
<i>S. immobilis</i>	5	10	8.789 (7.847-18.466)	16.584 (15.440-17.552)
<i>L. gibbus</i>	5	10	6.058 (3.375-8.024)	30.304 (n.d.)

\* Significantly different from the control (p < 0.05)

**Pseudokirchneriell sub Scenedesmus lemna**

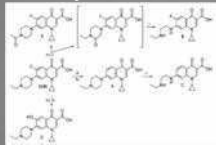
30

## Enrofloxacin nell'ambiente

- Molto stabile nel suolo
  - Si lega ai cationi metallici
  - Emivita >150 gg

- Fotosensibile

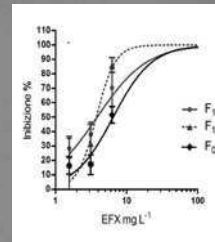
Degradazione molto rapida solo se esposta alla luce



Attività dei composti di degradazione?

## Il Test su *Dafnia magna*

- Durata 21 gg
- Alimentate con *S. dimorphus*
- Fotoperiodo 16 L : 8 B
- Temperatura  $20 \pm 1$  ° C



Inibizione non specifica dell'attività riproduttiva  
Alterazioni nelle prime fasi dello sviluppo  
Danni a livello embrionale

Quando

**PEC:PNEC >> 1**

**CHIMICO CON DEGRADAZIONE LENTA**  
(Idrolisi, fotolisi, mineralizzazione, biotrasformazione)

vengono imposte  
condizioni di impiego o smaltimento durante  
processo di registrazione (AIC)

- Riduzione delle quantità o dei cicli
- aumento dei tempi di degradazione nel letame
- minore quantità per ettaro
- aumento della profondità di aratura

Monitoraggio dei terreni

33

PEC <sub>suolo</sub>	66 mg/kg
PEC <sub>acqua superficiale</sub>	18,4 mg/L
DT <sub>50suolo</sub>	15 giorni
log K <sub>ow</sub>	6,2

### Ecotossicità terrestre

Piante	EC <sub>50</sub>	>4000 mg/ha
Lombrichi	LC <sub>50</sub>	>1000 mg/kg
Mosca	LC <sub>50</sub>	>10 mg/kg

### Ecotossicità acquatica

Alga verde	EC <sub>50</sub>	26 mg/L (72 h)
Dafnia	EC <sub>50</sub>	0,23 mg/L (24 h)
Pesce	EC <sub>50</sub>	0,13 mg/L (96 h)

Precauzioni in sede di registrazione animali trattati  
**NO**  
accesso a corsi acqua

depositi di letame  
almeno 10 m da corsi d'acqua

34

PEC <sub>suolo</sub>	134 mg/kg
PEC <sub>acqua superficiale</sub>	<0,01 mg/L
DT <sub>50suolo</sub>	300 giorni
DT <sub>50acqua</sub>	150 giorni
K <sub>oc</sub>	>20000
log K <sub>ow</sub>	4,5

### Ecotossicità terrestre

Piante	EC <sub>50</sub>	1000 mg/kg (21 giorni)
Lombrichi	LC <sub>50</sub>	13,7 mg/kg (21 giorni)

### Ecotossicità acquatica

Alga verde	EC <sub>50</sub>	0,056 mg/L (72 h)
Dafnia	EC <sub>50</sub>	0,085 mg/L (48 h)
	NOEC	0,024 mg/L (21 giorni)
Pesce	EC <sub>50</sub>	0,128 mg/L (96 h)

Precauzioni in sede di registrazione

(Nonilfenolo)  
In eccesso  
Va scartato  
NON nel letame

Ma come rifiuto pericoloso

35

## ERA

PEC <sub>suolo</sub>	892 mg/kg
PEC <sub>acqua di falda</sub>	6,1 mg/L
DT <sub>50suolo</sub>	>60 giorni
K <sub>oc</sub>	8200
log K <sub>ow</sub>	-0,03

### Ecotossicità terrestre

Piante	EC <sub>50</sub>	116 mg/kg (21 gg)
Lombrichi	LC <sub>50</sub>	>918 mg/kg (28 gg)

### Ecotossicità acquatica

Alga verde	EC <sub>50</sub>	0,16 mg/L (96 h)
Dafnia	EC <sub>50</sub>	57 mg/L (48 h)
Pesce	LC <sub>50</sub>	851 mg/L (96 h)

Precauzioni in sede di registrazione

nessuna

PEC/PNEC <1

PEC/PNEC >9,18 mg/kg

PEC/PNEC <1

### Veterinary medicines that have a high potential of entering the environment

Stars indicate compounds that have been monitored and detected (18).

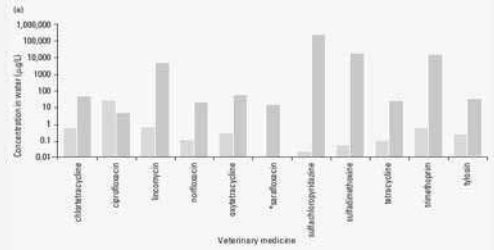
- |                     |                        |                           |
|---------------------|------------------------|---------------------------|
| amitraz             | enrofloxacin           | oxolinic acid*            |
| amoxicillin         | fenbendazole           | oxytetracycline*          |
| amprolium           | flavomycin             | phosmet                   |
| antiseptics         | flavophospholipol      | piperoyl butoxide         |
| baquoloprim         | florfenicol            | poloxalene                |
| cephalexin          | flumethrin             | procaine benzylpenicillin |
| chlortetracycline*  | immunological products | procaine penicillin       |
| clavulanic acid     | ivermectin*            | robenidine hydrochloride  |
| clindamycin         | lasalocid sodium       | salinomycin sodium        |
| clopidol            | levamisole             | sarafloxacin*             |
| cypermethrin*       | lido/ligocaine HCL     | sulphadiazine             |
| cyromazine          | lincomycin*            | tetracycline*             |
| decoquinat          | maduramicin            | tiamulin                  |
| deltamethrin        | monensin               | tilmicosin                |
| diazinon*           | morantel               | toflazuril                |
| diclozauril         | neomycin               | triclabendazole           |
| dihydrostreptomycin | nicarbazin             | trimethoprim*             |
| dimethicone         | nitroxylin             | tylosin*                  |
| omacetin benzoate*  |                        |                           |

Source: Data from Ref. 10.

FIGURE 2

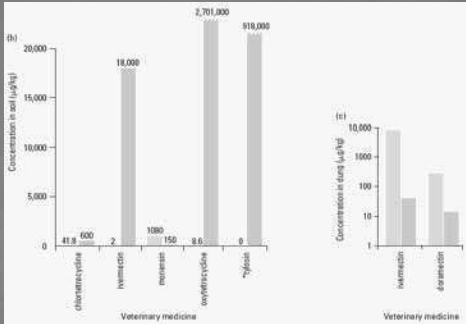
### Concentrations of select veterinary medicines in water, soil, and dung samples

Green bars give the concentrations measured in the environment, and blue bars show the effective concentration (EC<sub>50</sub>) or maximum inhibitory concentration of each medicine with standard test organisms in (a) water, (b) soil, and (c) dung samples. Starred compounds were not detected, and EC<sub>50</sub> for oxytetracycline and tylosin are off scale. The comparison indicates that veterinary medicines may not pose much of a risk to the environment, except in dung.



Boxall et al. Environmental Science and Technology 2003

### I FARMACI VETERINARI POSSONO CAUSARE UN VERO RISCHIO ? ?



Boxall et al. Environmental Science and Technology 2003

### Italia 2008: 10-20 % dei macrolidi e chinoloni prescritti sono finiti negli impianti di depurazione (Zuccato et al., 2010)

Zuccato et al. Journal of Microencapsulation 279 (2010) 1042-1049

1049

Table 1

Local (mg/kg) (SD) (value) of antibiotics in influents and effluents of the four STPs.

Antibiotics	Milano (mean ± SD) ?		Varese (mean ± SD) ?		Lugano (mean ± SD) ?		Cremona (mean ± SD) ?	
	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent
<b>Penicillins</b>								
Ampicillin	nd	nd	6.05 ± 0.93	nd	382 ± 453	37 ± 24	21 ± 15	nd
<b>Quinolones</b>								
Ciprofloxacin	32 ± 12	24 ± 45	202 ± 121	89 ± 80	45 ± 6.0	nd	108 ± 15	nd
± Benzoxaphenone	2.7 ± 6.0	5.3 ± 1.6	164 ± 134	27 ± 4.96	0.31 ± 0.60	nd	20 ± 25	4.9 ± 8.4
<b>Macrolides-Tetracyclines</b>								
Clarithromycin	22 ± 7.4	104 ± 26	121 ± 40	32 ± 41	318 ± 41	437 ± 70	939 ± 467	506 ± 89
Erythromycin	0.39 ± 0.9	34 ± 5.5	4.0 ± 2.6	2.7 ± 1.5	0.59 ± 1.1	5.0 ± 8.2	nd	45.6 ± 1.2
Erythromycin-β-D	nd	nd	nd	nd	nd	nd	25 ± 3.7	37 ± 4.5
Linezolid	15 ± 3.7	49 ± 1.5	1.9 ± 3.0	2.6 ± 1.5	924 ± 0.2	1.3 ± 1.2	10 ± 6.6	3.8 ± 2.7
Spiramycin	44 ± 11	121 ± 30	234 ± 155	146 ± 63	1.2 ± 1.5	303 ± 179	97 ± 21	73 ± 24
<b>Sulfonamides</b>								
Sulfamethoxazole	40 ± 21	16 ± 2.6	97 ± 18	11 ± 1.8	33 ± 15	13 ± 11	33 ± 44	10 ± 5.8
<b>Cyclopropyls</b>								
Vinclozoxin	8.6 ± 1.8	5.2 ± 0.5	14 ± 20	8.6 ± 1.9	nd	24 ± 13	nd	4.4 ± 6.7
<b>Veterinary antelmintics</b>								
Oxibendazole	nd	nd	0.17 ± 0.50	1.2 ± 0.3	nd	nd	nd	nd
Oxytricyazole	nd	0.24 ± 0.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Thiabendazole	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Tylosin	4.0 ± 3.0	1.0 ± 1.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total loads (mg/kg) (SD) (value)	459 ± 76	187 ± 58	801 ± 75	388 ± 68	740 ± 438	866 ± 341	1361 ± 543	653 ± 133

GRAZIE A

DR SSA PAOLA ANFOSSI  
DR SSA ANNALISA ZONCA

E A VOI TUTTI  
PER L'ATTENZIONE



**MAGDA ARDIZIO e  
CARLO CASTELLINA**  
**Problematiche terapeutiche**





## IL SETTORE AVICOLO RURALE

Problematiche terapeutiche

Dott.ssa Magda Ardizio  
Dott. Carlo Castellina

## INTRODUZIONE: I NUMERI DEL SETTORE

Il comparto rurale

- 50 milioni di pulcini colorati da carne
- 10 milioni esportati in altri paesi Europei
- 15% del consumo nazionale
- 1.500 occupati nel settore
- 5.000 indirettamente (indotto)

*Dati: ERPA (European Rural Poultry Association)*



## I LIVELLI DEL COMPARTO RURALE

- Aziende di riproduzione
- Incubatoi
- Ingrasso rurale ("produzioni diversificate")
- Svezinatori
- Piccoli allevamenti
- Gruppi familiari

## INTRODUZIONE: I "LIVELLI" Riproduttori e Incubatoi

Aziende di riproduzione e incubatoi non hanno differenze sostanziali rispetto a gruppi industriali dal punto di vista

- Sanitario
- Tecnico
- Produttivo

## INTRODUZIONE: I "LIVELLI" Produzioni "diversificate"

REG. CEE 543/2008  
Commercializzazione carni di pollame

Pollo "rurale all'aperto"

## INTRODUZIONE: I "LIVELLI" Produzioni "diversificate"

Per poter essere definito Pollo Rurale all'aperto

- 12 capi m<sup>2</sup> e non più di 25 Kg m<sup>2</sup>
- 6,25 capi m<sup>2</sup> per capponi oltre i 91 giorni
- Numero massimo di capi per ricovero 4800 (2500 per capponi)
- Dalle 6 settimane devono avere accesso a parchetti esterni (di almeno 2 m<sup>2</sup> per capo o 4 m<sup>2</sup> per capo per capponi)
- Età minima macellazione 81 per polli e 150 per capponi



## INTRODUZIONE: I "LIVELLI" Gli svezzatori

Aziende di dimensioni molto variabili, multietà e multirazza



## INTRODUZIONE: I "LIVELLI" Gli svezzatori

La categoria risulta essere a forte rischio biologico, in quanto commercia con altri produttori, alleva multirazza e multietà.

Gli animali svezzati vengono venduti verso piccole unità, frammentate sul territorio

## INTRODUZIONE: I "LIVELLI" Inferiori ai 250 capi

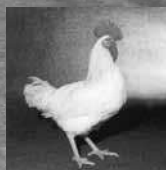
Clienti di svezzatori o incubatoi: ricevono gli animali e li allevano per hobby, autoconsumo, vendita locale



## LA FILOSOFIA DEL PICCOLO

Chi alleva i piccoli gruppi?

- Persone anziane
- Immigrati stranieri
- Ma anche produzioni tipiche di qualità



## LA FILOSOFIA DEL PICCOLO

Sempre più di moda (Slow Food, Eataly) e sempre più richieste (e pagate) le produzioni locali ma si scontrano con queste problematiche tecniche

- Difficoltà ad avere delle produzioni di qualità
- Difficoltà nel gestire sanitarmente i gruppi
- Difficoltà nel reperire un supporto tecnico

Impediscono al piccolo allevatore di ottenere un utile

## PUNTI CRITICI DEL SETTORE

	RIPRODUTTORI	INCUBATOI	INGRASSO RURALE	SVEZZATORI	PRIVATI
Multirazza					
Multietà					
Multispecie					
Livelli bassi biosicurezza					
Difficoltà nei controlli					
Difficoltà nei trattamenti					

Quest'area di rischio rimane la più difficile da gestire

## PICCOLI PRODUTTORI: DIAGNOSI

La prima difficoltà che si incontra nel settore piccoli produttori è effettuare un corretto processo diagnostico.

Parlando di piccolissimi allevatori il valore totale dei capi spesso non giustifica il costo della visita del Medico Veterinario

- Visita Vet. Minimo 32,86 €
- Necroscopia 27,13 €

Fonte: Studio indicativo compensi FNOVI

## PICCOLI PRODUTTORI DIAGNOSI

Difficilmente si potranno richiedere analisi di laboratorio

- Per i costi
- Per le difficoltà di gestione e le tempistiche
- Per i materiali di prelievo (scelta conservativa)

## IL PICCOLO PRODUTTORE IL TRATTAMENTO

Problema cardine di tutto il comparto piccoli produttori è la reperibilità di farmaci in adeguate confezioni

- Spesso si possono reperire i principi attivi necessari ma in confezioni troppo grandi per un piccolo produttore

## COSA SI TROVA

P.A.	COSTO al privato	KG	TRATT. CONF
levamisolo	€ 45,00	8000 Kg	
amprolium	€ 66,00	7000 Kg	
sulfachinossalina sale sodico	€ 17,30	120 Kg	
lincomicina+spectinomina	€ 85,00	2500 Kg	
ossitetraclina 20%	€ 32,00	4000 Kg	
amoxi+colistina	€ 116,00	33000 Kg	
trimethoprim-sulfadiazina	€ 30,00	5000 Kg	
tilosina 20%	€ 33,55	16000 Kg	
amoxicillina triidrato	€ 82,00	12500 Kg	
enrofloxacin	€ 180,00	10000 Kg	
colistina 12%	€ 13,20	15000 Kg	
amminosidina 20%	€ 160,00	8000 Kg	

## IL PICCOLO PRODUTTORE IL TRATTAMENTO

La reperibilità di confezioni in quantità eccessive porta a 2 problemi

- Non si effettua il trattamento perchè troppo oneroso rispetto al valore dei capi
  - Mantenimento della malattia, che non viene curata
- Si effettua il trattamento e un'alta percentuale del farmaco non viene utilizzata
  - Costo sociale di smaltimento dell'eccesso
  - Rischio derivante dalla detenzione del surplus di farmaco da parte del piccolo produttore

## IL PICCOLO PRODUTTORE IL TRATTAMENTO

La detenzione del surplus per un uso successivo non è prevista per gli allevamenti che non abbiano un registro dei farmaci

- Nel caso il prodotto conservato venisse utilizzato successivamente la deteriorabilità del prodotto può portare ad un rischio sanitario grave (es. formazione di antibiotico resistenze)

## IL PICCOLO PRODUTTORE IL TRATTAMENTO

Spesso, per ovviare a queste carenze, il piccolo produttore si rivolge a rivendite di mangimi che commercializzano prodotti a libera vendita per uccelli da voliera

## IL PICCOLO PRODUTTORE LE VACCINAZIONI

Anche per quanto riguarda i presidi vaccinali spesso è difficile reperire quantità adeguate (e in costi adeguati)

- Bronchite Infettiva
- Coccidiosi
- Vaccini spenti per NDV e BI
- **MAREK** (per richiami successivi all'incubatoio o per schiuse "casalinghe")

## COSA SI TROVA

VACCINO	COSTO	DOSI	
Marek ceppo Rispens	€ 10,00	1000 dosi	<b>AZOTO !!</b>
NDV	€ 4,80	50 dosi	
Vaiolo	€ 7,20	100 dosi	
Bronchite H120	€ 4,40	1000 dosi	
Bronchite IB4/91 - IB88	€ 18,90	2000 dosi	

## IL PICCOLO PRODUTTORE LE PROFILASSI

Non sono reperibili sul mercato quantitativi idonei di p.a. per la profilassi delle parassitosi intestinali, grave piaga che colpisce duramente gli allevamenti rurali, che spesso hanno paddock esterni



## Es. parassitosi intestinale

- Visita M.Vet – Diagnosi = 32,86+IVA
  - Prescrizione (ricetta triplice copia) = gratis
  - Farmaco (es. levamisolo) = 46 €
  - In più i costi indiretti di reperimento farmaco (difficilmente quantificabili in tempo e denaro)
- Ricordiamo che spesso sono farmaci trattati da grossisti e farmacie specializzate. Non sempre di facile reperibilità

## I CONIGLI

Per quanto riguarda il settore rurale del coniglio, pur essendoci vaccini in dosi adeguate, spesso il piccolo allevatore ha poca conoscenza delle malattie e della possibilità di vaccinazione

Problemi analoghi per quanto riguarda le terapie



## DESIDERI

COSA SERVIREBBE	Kg da trattare da / a	
levamisolo	100 Kg	500 Kg
amprolium	100 Kg	500 Kg
enrofloxacin	100 Kg	500 Kg
colistina	100 Kg	500 Kg
Trimethoprim / su	100 Kg	500 Kg
amoxiciclina	100 Kg	500 Kg
flubendazolo	500 Kg	1000 Kg

Fonte: Interviste VeLLP campo avicolo rurale

## LA NORMATIVA

- DL 193 art 11 punto 1: "Ove non esistano medicinali veterinari autorizzati per trattare una determinata affezione di specie animali destinati alla produzione di alimenti il veterinario responsabile può, sotto la propria responsabilità al fine di evitare stati di sofferenza, trattare l'animale:

a. Medicinale Veterinario autorizzato in Italia per un'altra specie o per un'altra affezione

b. In mancanza di un medicinale di cui alla lettera a.

1. con un medicinale autorizzato per uso umano

2. con un medicinale veterinario autorizzato in un altro stato membro [...]

c. in mancanza di un medicinale di cui alla lettera b. Con un medicinale veterinario preparato estemporaneamente da un farmacista [...]

AVREMMO LA LEGISLAZIONE PER L'USO IN DEROGA CHE POTREBBE DARE UNA MANO AL SETTORE RURALE, MA ABBIAMO ANCHE UNA PRODUZIONE DI FARMACI SPECIFICI PER AVICOLI DESTINATA ALL'ALLEVAMENTO INDUSTRIALE QUINDI IN GRANDI CONFEZIONI

## LA NORMATIVA

- DL 193 art. 76 punto 2: "I medici veterinari nel prescrivere i medicinali veterinari devono limitarne la quantità al minimo necessario per il trattamento o la terapia"

## CONCLUSIONI

Il settore, per sua natura a rischio, in mancanza di strumenti profilattici tende a essere un pericoloso reservoir di patologie

- NDV
- Colera Aviare
- Vaiolo
- Bronchite

## CONCLUSIONI

LE DIFFICOLTA', SIA DI TIPO ECONOMICO CHE TECNICO (MANCANZA FARMACI ETC..) PER IL PICCOLO PRODUTTORE DI GESTIRE SANITARIAMENTE IL GRUPPO POSSONO PORTARE A SITUAZIONI DI RISCHIO PER LA SALUTE UMANA:

- UTILIZZO DI FARMACI USO UMANO: TEMPI SOSPENSIONE, DOSAGGI, ANTIBIOTICORESISTENZE
- DETENZIONE SCORRETTA FARMACI: FARMACI SCADUTI, ALTERATI

È RISCHIO PER LA SALUTE ANIMALE:

- PROBLEMI DI BENESSERE: MANCATA TERAPIA, TOSSICOSI DA FARMACO, ANTIBIOTICORESISTENZE

## CONCLUSIONI

L'utilizzo dei farmaci nei piccoli allevamenti non risulta ottimale: mancano supporto tecnico, preparazione degli allevatori, principi attivi in adeguate quantità.

## CONCLUSIONI

Occuparsi del settore rurale significa occuparsi delle 20 galline nel pollaio e delle galline riproduttrici con la stessa serietà e competenza.

Sia per chi fa il Veterinario in campo, chi lo fa in ambito ASL, chi produce e vende farmaci

- Anagrafi avi-cunicole

## RINGRAZIAMENTI

Volevamo ringraziare:

- Tutti i colleghi che abbiamo intervistato e che ci hanno dato un prezioso contributo
- Tutte le farmacie e case farmaceutiche contattate

## GRAZIE A TUTTI



**ALESSANDRA PERRELLA**

**Farmacovigilanza in avicoltura.  
Il punto di vista del Ministero della Salute**

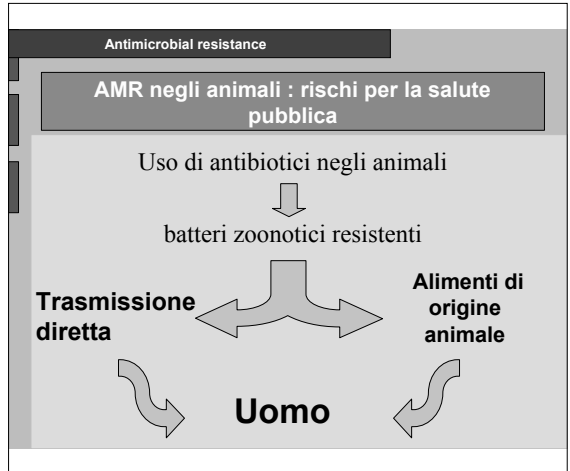





 Ministero della Salute  
 Dipartimento per la sanità pubblica veterinaria, la sicurezza alimentare e gli Organi Collegiali per la tutela della Salute  
 Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari  
 Ufficio IV

**CONVEGNO : Uso responsabile degli antibiotici in avicoltura**  
**FARMACOSORVEGLIANZA IN AVICOLTURA. IL PUNTO DI VISTA DEL MINISTERO DELLA SALUTE**

Salsomaggiore Terme 12 ottobre 2012



**I pericoli**

**MRSA (Stafilococcus Aureus meticillino-resistente)**

**Stafilococcus Pseudo-intermedius meticillino- resistente**

**ESBL (Beta Lattamasi a spettro esteso) + AmpC Beta Lattamasi**

↓

*Klebsiella , Escherichia coli, Enterobacter, Salmonella, Proteus, Citrobacter, Morganella morganii, Serratia marcescens, Shigella dysenteriae, Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia e Capnocytophaga ochracea.*

COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL PARLAMENTO EUROPEO E AL CONSIGLIO Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR) /\* COM/2011/0748 definitivo

**Più di 25.000 morti nell'Unione Europea ogni anno per infezioni causate da batteri antibioticoresistenti**

**Gli antibiotici critici per la medicina umana**

Cefalosporine di 3° e 4° generazione

Chinoloni e fluoroichinoloni

Macrolidi

2<sup>nd</sup> WHO expert meeting (Copenhagen 2007)

Iniziative comunitarie : monitoraggio dei consumi, restrizioni normative, formazione, restrizioni all'uso in deroga (cascata), necessità di armonizzare le metodiche di ricerca dei residui, rafforzamento delle misure di biosicurezza negli allevamenti, cooperazione intersettoriale

- ESVAC PROJECT (mandato della Commissione Europea all'EMA di raccogliere i dati sulla vendita e l'utilizzo di medicinali veterinari in Europa)
- Consultations for amendmends to Directive 2001/82 under initiative of the Commission DG Health and Consumers
- Commission WG on AMR (DG Health and Consumers)
- CVO
- Referrals su tutti i medicinali veterinari a base di chinoloni/fluoroichinoloni e cefalosporine di 3° e 4°


 Ministero della Salute

## AMR e Dlvo 193/2006

Scorte di medicinali per uso umano negli impianti di cura (disciplina non applicabile agli antibatterici per uso ospedaliero)

Divieto di detenzione di scorte negli allevamenti di antibatterici orali per terapie di massa ( consentito quantitativo non superiore a quello necessario per 7 gg di terapia)

Monitoraggio da parte del Min Sal delle iniziative di formazione e sensibilizzazione per gli allevatori e veterinari per la promozione di un uso prudente

Penalizzazione dell' uso off-label al di fuori delle prescrizioni della cascata

## Specificità del medicinale veterinario

**Il medicinale veterinario non è una derivazione del medicinale per uso umano ma possiede una sua identità ed è studiato e sviluppato in funzione delle specie animali cui sarà destinato**

**La legislazione farmaceutica vigente prescrive procedure autorizzative per i medicinali veterinari da immettere sul mercato che ne garantiscono un alto livello di sicurezza ed efficacia quando utilizzati secondo le indicazioni d'uso del produttore. Oggigiorno l'impiego improprio, fatte salve le deroghe specifiche concesse dalla norma per gli usi e le specie minori (artt. 10 e 11 Dlvo 193/2006), non trova giustificazione.**

## USO IMPROPRIO

Dlvo 193 2006, art 1

n) Uso improprio: l'uso di un medicinale veterinario in modo non conforme a quanto indicato nel riassunto delle caratteristiche del prodotto; il termine si riferisce anche all'abuso grave o all'uso scorretto di un medicinale veterinario;

Art. 108

9. Salvo che il fatto costituisca reato, chiunque non osserva le prescrizioni imposte con le autorizzazioni rilasciate a norma del presente decreto e' soggetto al pagamento di una sanzione amministrativa pecuniaria da euro 2.582,00 a euro 15.493,00.

La farmacovigilanza è l'insieme delle azioni di controllo messe in atto dalle autorità competenti (MinSan, Regioni, AASSLL, N.A.S.) finalizzate a verificare che la distribuzione, la dispensazione e l'impiego del farmaco avvengano in maniera corretta.

Il Ministero della Salute accerta che i fabbricanti di medicinali veterinari e delle sostanze farmacologicamente attive utilizzate nella produzione di medicinali veterinari si attengano alle norme sulle buone prassi di fabbricazione

## SISTEMA NAZIONALE DI CONTROLLO DEL FARMACO VETERINARIO

**DPCM 29 nov 2001**

Controllo e vigilanza sulla distribuzione ed impiego del farmaco veterinario



programmi per la ricerca dei residui di trattamenti illeciti o impropri

Livelli essenziali di assistenza che devono essere garantiti a tutti i cittadini italiani con le risorse pubbliche (LEA)

Lo stesso DPCM 29 nov 2001 riconosce la necessità di definire criteri specifici di monitoraggio dell'assistenza erogata

Accordo Stato Regioni 23 marzo 2005 - art. 9

"Comitato paritetico permanente per la verifica dell'erogazione dei LEA"

(Istituito presso il Ministero della Salute)

## SISTEMA NAZIONALE DI CONTROLLO DEL FARMACO VETERINARIO



produzione

**Ministero della Salute**

autorizzazione, vigilanza e rilascio certificazioni GMP (officine di produzione di medicinali veterinari)  
vigilanza e rilascio certificazioni GMP (fabbricanti di sostanze farmacologicamente utilizzate nella produzione di medicinali veterinari)

**N.A.S.**

(Compiti delegati)



distribuzione  
dispensazione  
impiego

**Ministero della Salute**

(Indirizzo e coordinamenti, banca dati operatori, piano di campionamento annuale post-marketing)

**Regioni  
AASSLL**

piani regionali di Farmacovigilanza, trasmissione dati

**N.A.S.**



**I controlli svolti dalle Autorità Nazionali Competenti sul farmaco veterinario rientrano nelle attività previste dal Piano Nazionale Integrato predisposto ai sensi dell'art. 44 del Regolamento 882/2004/CE e i risultati di tali attività vengono pubblicati annualmente sul sito web del Ministero – Settore Salute ( <http://www.ministerosalute.it/sicurezzaAlimentare/paginaInternaMenuSicurezzaAlimentare.jsp?id=1144&lingua=italiano&menu=piani>) previsti nelle Relazioni Annuali (Annual Reports) previste dallo stesso piano.**

**Antimicrobial resistance**

**Iniziativa nazionale  
Antibioticoresistenza e uso responsabile degli  
antibiotici**

**Le attività del Ministero della Salute**

- Implementazione di SPC e foglietti illustrativi degli antimicrobici usati in medicina veterinaria per includere le avvertenze specifiche prescritte a conclusione delle relative procedure di Referral comunitari e per garantire un uso prudente degli stessi
- Preparazione di opuscoli e creazione di pagine web specifiche sull'argomento contenenti i principi per un uso prudente degli antibiotici, ispirato ai principi divulgati da varie comunità e le organizzazioni internazionali (Commissione europea, EMEA, Codex, FAO, OMS, ecc.)
- Sviluppo di linee guida specie-specifico sull'uso prudente dei medicinali per veterinari
- Indirizzo e coordinamento delle attività di controllo ufficiale svolte sul territorio

**Antimicrobial resistance**

**Nucleo Nazionale di Farmacosorveglianza  
sui medicinali veterinari**

(Decreto Ministeriale 14 maggio 2009 del Ministero del lavoro, della salute e delle politiche sociali recante: «Caratteristiche strutturali e modalità operative del nucleo nazionale di farmacosorveglianza sui medicinali veterinari – GURO serie generale n. 198 del 27 agosto 2009»)

**Mandato (art. 1) :**

- supporto alle attività di coordinamento delle regioni e delle province autonome nell'ambito delle ispezioni e dei controlli svolti dai servizi veterinari delle ASL

**Composizione (art. 2) :**

- 2 rappresentanti del Ministero della Salute
- 2 rappresentanti delle Regioni e delle province autonome
- 1 rappresentante Nucleo dei Carabinieri per la Tutela della Salute
- 1 rappresentante della Guardia di Finanza
- 1 rappresentante per gli Istituti zooprofilattici sperimentali
- 1 rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità

**Input operativi (art. 5)**

Flussi informativi provenienti annualmente dagli stessi enti coinvolti nell'attività di controllo sui medicinali veterinari.



**Iniziativa del Ministero della Salute**

*IMPLEMENTAZIONE DELLE ATTIVITÀ DI CONTROLLO EFFETTUATE SUL TERRITORIO*

**LINEE GUIDA PER LA PREDISPOSIZIONE, EFFETTUAZIONE E GESTIONE DEI CONTROLLI SULLA DISTRIBUZIONE E L'IMPIEGO DEI MEDICINALI VETERINARI ( con check list per l'agevolazione e la standardizzazione dei controlli svolti dagli organismi territoriali competenti)**

**Iniziativa del Ministero della Salute**

**LINEE GUIDA PER LA PREDISPOSIZIONE, EFFETTUAZIONE E GESTIONE DEI CONTROLLI SULLA DISTRIBUZIONE E L'IMPIEGO DEI MEDICINALI VETERINARI**

Omissis.....

Obiettivo della presente linea guida è quello di fornire alle Regioni e altri organismi di controllo operanti sul territorio indicazioni operative al fine della programmazione e attuazione della propria attività di farmacosorveglianza presso allevamenti, grossisti di medicinali veterinari, farmacie, ambulatori e veterinari zoiatri per garantirne una esecuzione omogenea sul territorio nazionale, ripetibile per tutti gli operatori e trasparente nel processo che lo governa.

Omissis.....

## Iniziative del Ministero della Salute

### LINEE GUIDA PER LA PREDISPOSIZIONE, EFFETTUAZIONE E GESTIONE DEI CONTROLLI SULLA DISTRIBUZIONE E L'IMPIEGO DEI MEDICINALI VETERINARI

Omissis.....

Le Regioni e le Province autonome:

- predispongono piani di sorveglianza sul farmaco veterinario, **tenendo conto del n° minimo di controlli richiesti dalla norme e sulla base di indicatori di rischio e di valutazioni di congruità dell'uso;**
- coordinano le attività delle aziende sanitarie in dipendenza delle tipologie di allevamento e delle esigenze di tutela sanitaria esistenti sul territorio di competenza.

L'elaborazione e l'attuazione dei suddetti piani deve tener conto di tutti i requisiti previsti dal Regolamento CE 882/2004. In particolare i controlli ufficiali ad opera delle autorità competenti sono eseguiti secondo procedure documentate. Dette procedure comportano informazioni e istruzioni per il personale che esegue i controlli ufficiali e la ricognizione delle cose da fare tenendo conto dei vincoli di carattere normativo cogente; fatti salvi i livelli minimi di controllo previsti dalle disposizioni vigenti. I Piani di Farmacosorveglianza devono far riferimento alla necessità di effettuare i controlli sulla base del rischio; contengono elementi che fanno riferimento alla necessità di valutare le risorse necessarie per effettuare i controlli ufficiali programmati; fanno riferimento alla necessità che sia effettuato il monitoraggio della loro attuazione (garanzia che sia fatto quanto programmato) e prevedono la verifica dell'efficacia dei controlli ufficiali eseguiti.

Omissis.....

### FINALITA' DELLE ATTIVITA' DI CONTROLLO SVOLTE DALLE AASSLL

Ciascuna A.S.L., utilizzando le apposite check list riportate nella presente linee guida, dovrà:

Ispezionare, almeno una volta l'anno, le attività di deposito e commercio all'ingrosso e vendita diretta di medicinali veterinari al fine di accertare la corretta registrazione e la tenuta della documentazione di carico-scarico delle sostanze attive (laddove applicabile) e dei medicinali veterinari venduti e la loro regolarità

Ispezionare, almeno una volta l'anno, i titolari di allevamenti DPA provvisti di scorta di impianto, e allevamenti di animali DPA, in cui viene dichiarata l'assenza di trattamenti.



### FINALITA' DELLE ATTIVITA' DI CONTROLLO SVOLTE DALLE AASSLL

Ispezionare, almeno una volta l'anno, i fabbricanti di premiscelate per alimenti medicamentosi autorizzati alla vendita diretta di medicinali veterinari, al fine di accertare la corretta registrazione e la tenuta della documentazione di carico-scarico delle premiscelate vendute e la loro regolarità. E' fatta salva la competenza esclusiva del Ministero della Salute nell'ambito dell'attività di controllo delle sostanze farmacologicamente attive utilizzate dai suddetti fabbricanti per la relativa produzione.

Ispezionare, entro un congruo tempo (tre anni) le farmacie per definire la categoria del rischio di appartenenza (alto, medio, basso) e la conseguente frequenza dei controlli (rischio alto: almeno 1 controllo/anno; rischio medio: almeno 1 controllo/2 anni; rischio basso: almeno 1 controllo/3 anni)



### FINALITA' DELLE ATTIVITA' DI CONTROLLO SVOLTE DALLE AASSLL

Ispezionare, entro un congruo tempo (tre anni), le altre attività (allevamenti non DPA e di animali DPA senza scorta di impianto, impianti di cura, scorte proprie per attività zootecnica) per definire la categoria del rischio di appartenenza (alto, medio, basso) e la conseguente frequenza dei controlli (rischio alto: almeno 1 controllo/anno; rischio medio: almeno 1 controllo/2 anni; rischio basso: almeno 1 controllo/3 anni)

Ispezionare al termine del periodo di adeguamento prescritto gli operatori in cui siano state riscontrate delle non conformità in sede di controllo

Predisporre piani di controllo territoriale mirato

Assicurare vigilanza e controllo costante su modalità prescrittive.



=



.....gli indicatori di rischio da considerare sono management aziendale, quantità e tipologia dei farmaci veterinari utilizzati, modalità di registrazione dei trattamenti e congruità delle scorte con la reale esigenza connessa alle dimensioni e tipologia di allevamento.



..... verifica della coerenza (per quantità e tipologia) dei medicinali presenti nella scorta e dei trattamenti eseguiti alla realtà zootecnica e alla situazione epidemiologica presenti nell'allevamento.

..... valutare l'adeguatezza dell'impiego del farmaco veterinario in relazione alle indicazioni, le specie di destinazione, le avvertenze, le precauzioni per l'impiego riportate nei relativi SPC/foglietti illustrativi. ....



..... Fatto salvo l'uso in deroga ai sensi degli artt. 10 e 11 del Dlgs 193/2006 e le situazioni di eventuale difformità a quanto riportato nei foglietti illustrativi sulla base di specifiche disposizioni di Polizia Veterinaria, qualsiasi violazione di tali prescrizioni è sanzionabile ai sensi dell'art. 108(9) dello stesso Decreto.

.....Particolare attenzione deve essere rivolta all'uso degli antibiotici.....

.....Bisogna soprattutto diffidare delle situazioni caratterizzate dal ricorso alla sierologia come unico mezzo diagnostico. La prassi di valutare soltanto sierologicamente la presenza dell'agente patogeno (in assenza di isolamento, segni clinici o lesioni) potrebbe mascherare un uso degli antibiotici come growth promoters.....

.....al fine di tali valutazioni è anche opportuno procedere alla verifica dell'esistenza, e eventuale relativo utilizzo, di presidi medici (vaccini e vaccini stabulogeni) e nutrizionali (integratori e additivi zootecnici) per la prevenzione specifica delle malattie ricorrenti nell'allevamento.....

## CHECK LIST

IMPIANTI DI ALLEVAMENTO E CUSTODIA ANIMALI PRODUTTORI DI ALIMENTO PER L'UOMO (D.Lgs 193/2006 artt. 79(3), 80(3), 81)

IMPIANTI DI ALLEVAMENTO E CUSTODIA DI ANIMALI NON DESTINATI ALLA PRODUZIONE DI ALIMENTO PER L'UOMO (D.Lgs 193/2006, artt. 76(8); 80 (3); 82)

ESERCIZI DI VENDITA ALL'INGROSSO DI MEDICINALI VETERINARI E SOSTANZE FARMACOLOGICAMENTE ATTIVE E DI VENDITA DIRETTA DI MEDICINALI VETERINARI (artt. 66-68-69-70-71-72-73-74, D.Lgs 193/06)

FARMACIE (D.Lgs 193/2006 artt. 71(3), 76(8))

IMPIANTI DI CURA E PER ATTIVITA' ZOOIATRICA (D.Lgs 193/2006 artt. 76(8), 80(3), 84, 85)

IMPIANTI DI PRODUZIONE MANGIMI MEDICATI E PRODOTTI INTERMEDI

## CHECK LIST

Al fine di acquisire utili elementi di valutazione di congruità e di consentire un'adeguata programmazione degli interventi di farmacovigilanza, è stata inserita IN OGNI check-list una rilevazione sui volumi di prescrizione, avendo come base temporale di riferimento gli ultimi 12 mesi di attività

### Manuale di biosicurezza ed uso responsabile degli antibiotici in zootecnia" (nota DGSAF 2657 del

13/02/2012).

Scopo di tale manuale è quello di esaltare le procedure gestionali finalizzate al rafforzamento della biosicurezza e alla cura del benessere animale (fattori che giocano un ruolo chiave sulla possibilità di ridurre l'uso terapeutico e preventivo/profilattico degli antibiotici in allevamento).

Nel manuale sono presenti tre sezioni specifiche sull'allevamento suino, avicolo e cunicolo.

### Manuale di biosicurezza ed uso responsabile degli antibiotici in zootecnia"

#### Disposizioni generali per i veterinari

- Management aziendale (biosicurezza, immunizzazione, selezione genetica, programmi nutrizionali, etc.)
- Terapia antibiotica solo per affezioni batteriche e sempre basata sull'antibiogramma dei batteri isolati dall'infezione o quantomeno sulla base di informazioni anamnestiche relative alla situazione epidemiologica e di sensibilità locale
- Registro di stalla con tutte le informazioni anamnestiche inerenti fallimenti terapeutici e reazioni avverse
- Presenza di adeguate procedure operative standard relative alle operazioni di miscelazione dei medicinali veterinari in polvere o liquidi da somministrare in acqua da bere/alimento liquido al fine di evitare l'errata misurazione e la dispersione nell'ambiente di principi farmacologicamente attivi
- Redazione di specifici protocolli operativi relativi alle modalità di effettuazione dei trattamenti farmacologici e delle relative modalità di attuazione al fine di evitare l'errata somministrazione (sotto-dosaggio, mancato rispetto della durata prevista per la terapia prescritta)
- Provvedere all'effettuazione di adeguati corsi di aggiornamento al personale dell'azienda.

### Manuale di biosicurezza ed uso responsabile degli antibiotici in zootecnia"

#### Disposizioni generali per i veterinari

- Iniziare trattamento antibiotico solo in presenza di malattia batterica in atto o, **ove ne sia dimostrata la necessità**, solo in presenza di reale rischio di infezione (a seguito di isolamento con adeguati mezzi diagnostici del patogeno) e in funzione della possibilità di ridurre effettivamente la mortalità e/o morbidità nel gruppo.
- Utilizzare sempre l'antibiotico a spettro più ridotto tra quelli risultanti efficaci
- Pieno rispetto delle prescrizioni dell' SPC/ foglietto illustrativo
- Limitare l'uso off-label solo alle situazioni previste dagli artt. 10 e 11 del Dlvo 193/2006.
- Evitare l'utilizzo di combinazioni empiriche (associazioni non autorizzate),
- Evitare di trattare casi cronici
- Utilizzo di fluorochinoloni e cefalosporine di 3° e 4° e antibiotici per uso umano (mai di prima scelta, vietate le cefalosporine di 3° e 4° nel pollame, divieto di utilizzo di antibiotici di ultima generazione presenti solo in umana anche per assenza di MRL)
- Segnalare all' AC qualsiasi mancata risposta clinica ad un trattamento antibiotico

Ad eccezione dei coccidiostatici, gli antibiotici (promotori di crescita) non possono venire utilizzati come additivi dei mangimi a decorrere dal 1° gennaio 2006 (Regolamento (CE) n. 1831/2003).

## SOSTENIBILITA'

Divulgazione delle informazioni

sistemi di gestione aziendale preventivi

condivisione degli oneri delle misure da attuare

Compito del veterinario è sostenere i produttori di pollame per interrompere l'uso routinario di antibiotici senza impatto sul benessere animale, o sulla redditività della loro attività.

### Strategie pratiche per ridurre la necessità di utilizzare antimicrobici nell'allevamento avicolo

- Status sanitario dello stock da accasare
- Biosicurezza
- Igiene dei mangimi e delle acque
- Prebiotici (polisaccaridi)
- Probiotici (esclusione competitiva)
- Acidificanti (acidi grassi a media e corta catena, acido acetico e acido formico)
- Alimentazione
- Programmi di immunizzazione

### Antimicrobial resistance

## Iniziative del Ministero della Salute IN PROGRESS.....

### SISTEMA NAZIONALE DI TRACCIABILITA' DEL FARMACO VETERINARIO

- **Banca dati Nazionale Distribuzione del farmaco veterinario** che dovrà raccogliere anche i dati di farmacovigilanza, in modo da consentire da parte degli enti coinvolti una attività mirata di controllo territoriale riferite alla corretta distribuzione ed impiego del farmaco veterinario

*Primo step :*

- **Codice a barre a lettura ottica** da applicare sulle singole confezioni di medicinali ad uso veterinario immesse in commercio (obbligatorio dallo 01/01/2008)

- **Prossimo step : Informatizzazione della ricetta medico-veterinaria** (in corso di predisposizione relativo decreto inerente la modifica delle ricette medico veterinarie attualmente esistenti)



DIREZIONE GENERALE DELLA SANITÀ ANIMALE E DEI FARMACI VETERINARI

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**

Per eventuali chiarimenti:

 [a.perrella@sanita.it](mailto:a.perrella@sanita.it)

 06 59946822

51° CONVEGNO SIPA

Salsomaggiore Terme 12 ottobre 2012







**LII CONVEGNO ANNUALE**

**COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**

Forlì, 11-12 Aprile 2013



## FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI CLINICI DI *C. PERFRINGENS* ISOLATI DA BROILER, TACCHINI DA CARNE E GALLINE OVAIOLE

Bano L.<sup>1</sup>, Giovanardi D.<sup>2</sup>, Bacchin C.<sup>1</sup>, Ferro T.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IZS delle Venezia, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso

<sup>2</sup> Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi 5, 37132 San Michele Extra, Verona

\*Corresponding Author. Email: lbano@izsvenezie.it, Tel: +39 0422 302 302

### Summary

The minimal inhibitory concentration (MIC) of five antimicrobial agents (phenoxymethylpenicillin potassium, amoxicillin, tylosin, tiamulin, oxytetracycline) was determined for 130 *C. perfringens* field strains isolated from 2009 to 2012 in 50 meat chicken, 50 meat turkey and 30 layer hen commercial farms. The test system was the standardized agar dilution MIC methodology described in the CLSI document M11-A8: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Seventh Edition (February 2012). The lowest MIC 50 and MIC 90 have been recorded for beta-lactamines (penicillin and amoxicillin) even if sporadic resistant strains (3%) with MIC > 0.5 have been detected in broilers and turkeys.

In meat chicken and meat turkey 86% of strains showed MIC values in the range of susceptibility for tylosin (0.125-0.5 µg/ml) but the increase of resistant (≥1 µg/ml) *C. perfringens* sub-populations was observed. Official break points for tiamulin are not available but strains with MIC values lower than 4 µg/ml are conventionally considered susceptible. On the basis of this definition, 86%, 88% and 90% of tested strains isolated from broilers, turkeys and layer hens respectively can be considered susceptible to tiamulin. *C. perfringens* tetracycline resistances are widely distributed in all the poultry categories considered in this paper but with the highest MIC values recorded in turkey where 78% of strains showed MICs ≥ 16 µg/ml.

Periodical reports are necessary to monitor antimicrobial resistances and to promote a more targeted and responsible use of antimicrobials in poultry.

### INTRODUZIONE

Il bando dell'utilizzo dei promotori di crescita con attività antimicrobica e delle fonti proteiche di origine animale quali le farine di pesce, ha determinato negli allevamenti avicoli un aumento delle patologie gastroenteriche e in particolare di quelle che vedono implicato *C. perfringens* quali l'enterite necrotica e la disbatteriosi (Ven Immersel *et al.*, 2009). *C. perfringens* è infatti in grado di causare malattia in seguito ad una sua proliferazione nel tubo gastroenterico e alla conseguente produzione di tossine tra le quali la tossina NetB che è stata intimamente associata alla comparsa sia della forma clinica che di quella sub-clinica di enterite necrotica (Keyburn *et al.*, 2008). Il controllo di queste patologie è affidato all'azione di antimicrobici attivi nei confronti di batteri Gram-positivi,

fra i quali i beta-lattamici, i macrolidi, le tetracicline, le pleuromutiline, i lincosamidi e, fuori Europa, la zinco-bacitracina. L'impiego di farmaci dovrebbe essere mirato nei confronti del ceppo di *C. perfringens* isolato in corso di malattia e possibilmente caratterizzato per quanto riguarda la presenza di alcuni markers genetici di patogenicità, ma tale approccio non è quasi mai attuabile poiché i tempi d'isolamento e di esecuzione di saggi di farmacosenibilità per gli anaerobi sono incompatibili con la necessità di trattare gli animali rapidamente per evitare pesanti perdite zootecniche.

Nasce quindi l'esigenza di periodici report sull'andamento delle farmacoresistenze di questo microrganismo, possibilmente mirati a testare l'efficacia di principi attivi registrati per le specie target, privilegiando ceppi isolati in corso di malattia. Con il presente studio si è voluto quindi determinare la MIC di alcuni antimicrobici impiegati nel pollame, verso ceppi clinici di *C. perfringens* isolati da broiler, tacchini da carne e galline ovaiole.

## MATERIALI E METODI

### *Ceppi batterici*

Lo studio è stato condotto su 130 ceppi di *C. perfringens* clinicamente rilevanti, isolati tra il 2009 e il 2012 da broiler (50), tacchini da carne (50) e galline ovaiole (30) di allevamenti commerciali del nord Italia. L'isolamento è stato eseguito su terreno non selettivo (agar sangue) incubato in condizioni d'anaerobiosi e i ceppi sono stati conservati a -80 °C in cryo-banks (Nalgene) sino all'esecuzione della prova di farmacosenibilità.

I ceppi di referenza *C. perfringens* ATCC 13124, *C. difficile* ATCC 700057, *B. fragilis* ATCC 25285 sono stati inclusi nello studio come controllo.

### *Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)*

Per la determinazione della MIC è stato utilizzato il metodo della diluizione in agar secondo il protocollo riportato nel manuale CLSI M11-A8 (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standard, Seventh Edition, febbraio 2012). I principi attivi esaminati sono stati: penicillina V (phenoxymethylpenicillinic acid potassium salt, P1382, Sigma-Aldrich), amoxicillina (amoxicilin powder, A8523, Sigma-Aldrich), tilosina (tylosin tatrtrate powder, T6134, Sigma-Aldrich), tiamulina (tiamulin fumarate powder, 46959, Sigma-Aldrich), ossitetraciclina (oxytetracycline hydrochloride, O5875-100G, Sigma-Aldrich). Gli standard analitici sono stati solubilizzati secondo le istruzioni del produttore. Come terreno base è stato impiegato il Brucella Agar (Oxoid) supplementato con emina (5 µg/ml), vitamina K (1 µg/ml) e sangue di montone laccato (5% v/v). Ciascun farmaco è stato incluso nel terreno a concentrazioni comprese tra 0,016 e 512 µg/ml e gli inoculi sono stati allestiti da sospensioni batteriche con torbidità pari a 0,5 McFarland. Le piastre inoculate sono state incubate a 35-37 °C per 48h in condizioni di anaerobiosi.

I risultati sono stati espressi in µg/ml e, per ciascun farmaco, è stata calcolata la MIC in grado di inibire la crescita del 50% e del 90% dei ceppi testati (MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> rispettivamente) nonché la media geometrica delle MIC.

## RISULTATI

La distribuzione delle MIC dei ceppi testati, le MIC<sub>50</sub> e le MIC<sub>90</sub> sono riportate in tabella 1.

I valori più bassi di MIC sono stati osservati nei confronti dei due beta lattamici testati, in tutte le categorie produttive sottoposte allo studio. Inoltre il 96% dei ceppi isolati da broiler, il 98% di quelli isolati da tacchino e il 100% di quelli isolati da ovaiole si sono collocati al di sotto del valore di MIC di sensibilità fissato a 0,5 µg/ml (CLSI, 2007).

Al contrario i valori maggiori di MIC sono stati rilevati nei confronti dell'ossitetraciclina verso la quale l'88% dei ceppi isolati da broiler, il 98% di quelli isolati da tacchino e l'83,3% di quelli isolati da ovaiole si è dimostrato resistente.

Tutti i ceppi isolati da ovaiole sono risultati sensibili alla tilosina mentre nel tacchino e nel broiler si può osservare una distribuzione bimodale dei ceppi rispetto ai valori di MIC (figura 1). Nella prima sub-popolazione si collocano i ceppi con valori di MIC ≤ 0,5 µg/ml (82% dei ceppi isolati da broiler e l'86% di quelli isolati da tacchino) mentre la seconda sub-popolazione è contenuta in un range compreso tra 2 e 32 µg/ml. Quest'ultimo gruppo di ceppi risulta pertanto separato dal primo da almeno 2 diluizioni e per tale ragione è da ritenersi composto da ceppi resistenti alla tilosina (EUCAST, 2000).

Per la tiamulina non esistono break point ma la distribuzione delle MIC indica chiaramente la presenza di 2 sub-popolazioni, sostanzialmente con la stessa numerosità, distinte da valori di 1 e 2 µg/ml. Tale peculiare distribuzione è stata osservata in ceppi isolati da tutte le 3 tipologie di pollame considerato.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mostrano come i betalattamici siano le molecole che presentano la maggiore efficacia *in vitro* nei confronti di ceppi clinici di *C. perfringens*.

Al contrario l'ossitetraciclina è la molecola verso cui si registra la maggiore percentuale di ceppi resistenti, sia nel pollo che nel tacchino.

La tilosina dimostra un'ottima efficacia nei confronti di ceppi di *C. perfringens* isolati da ovaiole, categoria per la quale tale molecola è registrata in Italia ed ampiamente utilizzata soprattutto in virtù della sua efficacia nei confronti dei micoplasmi. Tuttavia, nonostante la maggior parte dei ceppi isolati da polli e tacchini da carne risultino sensibili a tale principio attivo, si osserva l'insorgenza di sub-popolazioni resistenti in entrambi queste 2 categorie produttive.

La tiamulina è una molecola scarsamente utilizzata nell'allevamento del pollo da carne a causa della sua incompatibilità con alcuni ionofori impiegati comunemente per il contenimento della coccidiosi. Questa molecola potrebbe trovare spazio in quegli allevamenti di broiler dove è scelto un approccio vaccinale nei confronti della coccidiosi, o nella terapia delle forme gastroenteriche del tacchino e dell'enterite necrotica che sporadicamente si osserva nella gallina ovaiole (Dhillon *et al.*, 2004). Nonostante i valori di MIC tendenzialmente elevati (oltre il 50% di ceppi con MIC ≥ 2), l'efficacia *in vitro* della tiamulina appare incerta a causa della mancanza di break point definiti.

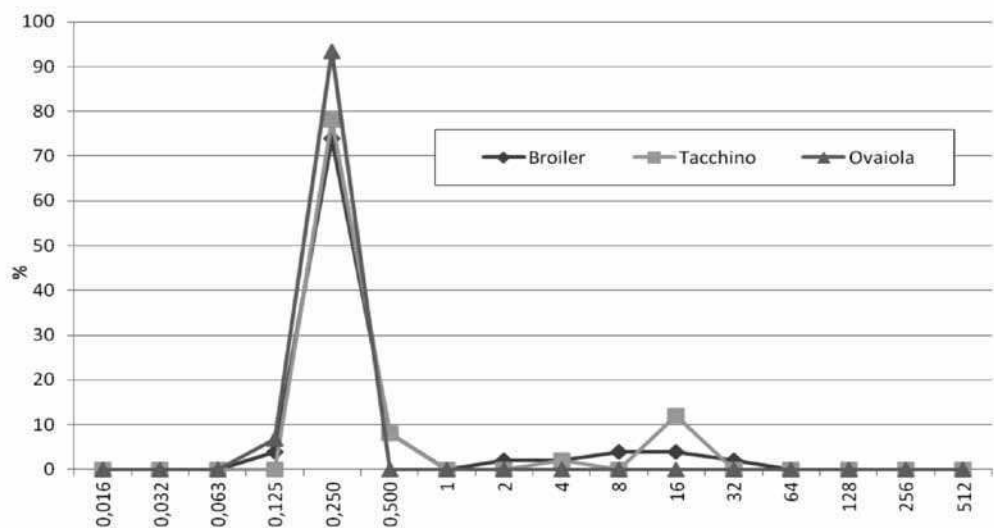
## BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, seventh ed. CLSI document M11-A7, vol. 27, No. 2. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.
2. Dhillon A. S., Roy P., Lauerma L., Schaberg D., Weber S., Bandli D., Wier F. 2004. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. Avian Diseases, 48:675-680.
3. EUCAST, 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Infect. 6, 503-508.
4. Keyburn L., Boyce J.D, Vaz P., Bannam T. L., Ford M.E., Parker D., Di Rubbo A., Rood J. I, Moore R. J. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. PLoS Pathog. 4: 0001-0011.
5. Van Immerseel F., Rood J. I., Moore R. J., Titbal R. W. 2009. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. Trends in Microbiology 17(1):32-36.

**Tabella 1.** Distribuzione delle minime concentrazioni inibenti, MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> dei principi attivi testati nei confronti di 130 ceppi di *C. perfringens* isolati da broiler (B), tacchino da carene (T), gallina ovaiola (O).

	MIC	(µg/ml)															MIC 50	MIC 90
	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512		
Penicillina V																		
B	0	0	3	24	18	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,25
T	0	0	2	26	19	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,25
O	0	0	0	16	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,125	0,5
Amoxicillina																		
B	1	21	11	15	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0,125
T	1	18	21	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0,125
O	0	0	0	16	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,063	0,125
Tilosina																		
B	0	0	0	2	37	4	0	1	1	2	2	1	0	0	0	0	0,25	4
T	0	0	0	0	39	4	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0,25	16
O	0	0	0	2	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,25
Tiamulina																		
B	0	0	0	0	3	14	3	8	15	5	2	0	0	0	0	0	2	8
T	0	0	0	0	5	22	3	3	20	2	0	0	0	0	0	0	1	4
O	0	0	0	0	0	12	1	3	11	2	1	0	0	0	0	0	2	4
Ossitetraciclina																		
B	0	0	0	0	0	2	4	0	2	9	12	19	2	0	0	0	16	32
T	0	0	0	0	0	0	1	3	2	5	9	12	15	3	0	0	32	64
O	0	0	0	0	0	3	2	0	2	7	8	7	1	0	0	0	16	32

**Figura 1.** Distribuzione dei ceppi rispetto ai valori di MIC della tilosina.





## **INFLUENZA DELLA COLONIZZAZIONE INTESTINALE DA *BRACHYSPIRA* SPP. SULLO STATO SANITARIO E SULLE PERFORMANCE PRODUTTIVE DI OVAIOLE COMMERCIALI**

Bano L.<sup>1\*</sup>, Trevisiol K.<sup>2</sup>, Tonon E.<sup>1</sup>, Ferro T.<sup>1</sup>, Furlan G.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>

1 *IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso*

2 *IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Bolzano, Via Bivio 59, 39100 Kaiserau, Bolzano*

\*Corresponding Author. Email: lbano@izsvenezie.it, Tel: +39 0422 302 302

### **Summary**

The present survey was designed to evaluate the prevalence of intestinal spirochaetes and disease association in Italian laying hen flocks. For these purposes fresh caecal faeces were collected in 34 farms and 74 sheds located in leading Italian egg-producing regions. Faecal samples were tested by means of PCR protocols and bacteriological examination for the presence of *Brachyspira* spp. and results were related to clinical signs, production problems, age and housing system. Intestinal spirochaetes were detected in 68.7% of the evaluated farms with both diagnostic methods (direct PCR from faeces and bacteriological examination). Intestinal spirochaetes known to be pathogenic for chicken (*B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli*) were detected in 37.5% and 46.8% of the farms tested by PCR and bacteriological examination respectively.

Intestinal spirochaetes were detected by PCR in significantly more sheds of chickens > 40 weeks of age (29/53 sheds, 54.7%) than in those ≤ 40 weeks of age (6/21 sheds, 28.5%) (P= 0.042).

There was a significant association (P=0.022) between colonization with spirochaetes and the occurrence of enteric disorders such as malabsorption, pasty vents and production of faeces stained eggshells. A significant association was observed also between reduced egg production and infection by intestinal spirochaetes (P=0.014) particularly when pathogenic species are considered (P=0.002). The egg drop was quantified in a variable percentage included between 3% and 9%. The highest prevalence was observed in free-range flocks (9/13) and in flocks hosted in sheds with scrapers used as manure removal system (4/4). All flocks hosted in the new enriched EU approved cages tested negative for intestinal spirochaetes (0/5). This study indicates that infections with avian intestinal spirochaetes are a common but probably under-estimated cause of enteric disorders and production problems in Italy.

### **INTRODUZIONE**

La spirochetosi intestinale aviaria (AIS) è una patologia causata da batteri Gram negativi, spiraliformi, appartenenti al genere *Brachyspira*. Nel pollame sono state segnalate 7 diverse specie di *Brachyspira* spp., ma attualmente solo tre sono ritenute in grado di causare la malattia: *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli* (McLaren *et al.*, 1997). Tra il pollame allevato la malattia è stata descritta in galline

ovaiole, polli riproduttori (Swine e McLaren, 1997), tacchini da carne (Shivaprasad e Duhamel, 2005), faraone (Bano 2007, osservazione personale) e oche (Names *et al.*, 2006). AIS è associata alla comparsa di sintomi enterici e a problemi produttivi la cui gravità varia a seconda della specie di *Brachyspira* implicata e del grado di colonizzazione. In gruppi di galline ovaiole affette da AIS è stata riportata diarrea cronica, aumento del contenuto idrico e lipidico nelle feci, ritardo dell'inizio della deposizione, riduzione della produzione d'uova e aumento della percentuale d'uova con guscio imbrattato da feci (Griffiths *et al.*, 1987, Dwars *et al.*, 1989, Dwars *et al.*, 1992, Swayne *et al.*, 1992, Trampel *et al.*, 1994). L'aumento del contenuto idrico nelle feci si ripercuote sullo stato della pollina (galline in gabbia) o della lettiera (galline a terra) con problematiche legate all'emissione di odori, pulizia dell'ambiente e aumento di mosche in allevamento (Phillips *et al.*, 2005).

Dato che la sintomatologia clinica e i problemi produttivi legati alla presenza di spirochete intestinali sono aspecifici, questa patologia è spesso sottodiagnosticata negli allevamenti da reddito. Ad oggi è stato condotto solo uno studio sulla prevalenza di spirochete intestinali in Italia ed ha riguardato allevamenti di ovaiole situati in provincia di Treviso. Tale indagine ha evidenziato una prevalenza pari al 34,4% riferita a spirochete intestinali patogene per il pollame (Bano *et al.*, 2008).

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati di un'indagine sulla diffusione di spirochete intestinali condotta in alcuni allevamenti commerciali di galline ovaiole campionati nelle tre regioni italiane a maggiore vocazione avicola: Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna. Inoltre sono state indagate anche gruppi di ovaiole free-range situati in provincia di Bolzano.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

L'indagine si è svolta in 74 capannoni afferenti a 32 allevamenti da reddito di galline ovaiole, distribuiti in Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna. In ciascun capannone sono stati raccolti almeno 50 g di feci ciecali di recente emissione, conferiti entro 8 ore dal prelievo al laboratorio di Treviso, e qui processati per la ricerca di spirochete intestinali mediante esame batteriologico e PCR. In 45 capannoni gli animali erano stabulati in gabbia: 30 con nastro trasportatore per l'allontanamento delle feci, 6 con fossa profonda per lo stoccaggio delle deiezioni e 4 con raschiatori posti al di sotto delle gabbie. Cinque gruppi di animali erano ospitati in gabbie arricchite strutturate secondo le indicazioni riportate nelle recenti norme europea in materia di benessere animale. 29 gruppi erano allevati a terra e di questi 13 erano free-range, 15 erano allevati su pavimento fessurato e 1 su lettiera convenzionale. Al momento del campionamento, per ciascun capannone veniva compilata una scheda anamnestica con indicazioni riguardanti l'età, la numerosità, l'eventuale esecuzione di trattamenti con antimicrobici nei 20 giorni precedenti il prelievo e la presenza di sintomi o di problemi produttivi compatibili con AIS.

### *Isolamento ed identificazione*

Da ciascun pool di feci sono stati condotti 2 esami batteriologici in terreno selettivo per spirochete intestinali BAM (Calderaro *et al.* 2001), supplementato con globuli rossi di montone. Le piastre sono state incubate a 37 °C in condizioni d'anaerobiosi e ispezionate ogni 48 ore fino al decimo giorno. La presenza di corpi batteri

morfologicamente riferibili a spirochete intestinali è stata valutata mediante esame microscopico in immersione e contrasto di fase.

In caso di presenza di corpi batterici morfologicamente compatibili con quelli di spirochete intestinali, le colture venivano isolate in purezza e sottoposte ad identificazione di genere e specie mediante protocolli di PCR precedentemente pubblicati o attraverso sequenziamento condotto sul 16SrRNA (Rohde *et al.*, 2002; La *et al.*, 2003; Phillips e Hampson, 2005; Weissenböck *et al.*, 2005).

#### *Ricerca Brachyspira spp. dalle feci tramite PCR*

Da ciascun campione fecale il DNA veniva estratto impiegando un estrattore automatico (Microlab Star<sup>LET</sup>, Hamilton) e il kit d'estrazione Mag Max<sup>TM</sup> Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). La presenza di *Brachyspira* spp. nelle feci è stata indagata attraverso protocolli di PCR precedentemente descritti (La *et al.*, 2003; Rohde *et al.*, 2002).

#### *Analisi statistica*

La presenza di spirochete intestinali nei vari gruppi analizzati è stata messa in relazione alla numerosità degli animali e al sistema di stabulazione degli animali impiegando il test di Fischer. Il test  $\chi^2$  è stato impiegato per studiare eventuali correlazioni fra infezione ed età del gruppo, e fra disturbi gastrointestinali e problemi produttivi. Riguardo alla numerosità in allevamento e all'età degli animali, i gruppi sono stati stratificati in 2 macrocategorie per ciascuna variabile: soggetti d'età  $\leq 40$  settimane e  $> 40$  settimane; gruppi con numero di animali  $\leq 20.000$  e  $> 20.000$ .

La sintomatologia e i problemi produttivi sono stati indagati anche rispetto alla presenza di spirochete intestinali ritenute patogene per il pollo (*B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli*).

## **RISULTATI**

La diffusione di spirochete intestinali negli allevamenti campionati è riportata in tabella 1.

La percentuale di allevamenti risultati positivi mediante esame colturale è risultata uguale a quella ottenuta mediante PCR, quest'ultima, tuttavia, ha permesso di individuare un maggior numero di capannoni positivi.

Gli allevamenti e i capannoni risultati positivi ad almeno uno dei 2 test sono stati rispettivamente il 75% e il 58% del totale. In 14 dei 35 gruppi risultati positivi mediante PCR non è stato possibile risalire sino all'identificazione di specie ma solo al genere *Brachyspira*. Otto gruppi sono risultati contemporaneamente infetti da 2 diverse specie di *Brachyspira* e 4 addirittura da 3 specie. Tramite esame batteriologico sono stati isolati in tutto 47 ceppi. Di questi 17 (36,3%) sono stati identificati come *B. innocens*, 1 (2,1%) come *B. murdochii*, 11 (23,4%) come *B. intermedia*, 14 (29,8%) come *B. pilosicoli*, 2 (4,2%) come *B. alvinipulli* e 2 (4,2%) non sono stati identificati.

La positività per spirochete intestinali è risultata superiore in gruppi d'età  $> 40$  settimane (29/53, 54,7%) rispetto a gruppi più giovani (6/21, 28,5%) e tale differenza si è rivelata statisticamente significativa ( $P=0.042$ ).

La percentuale di positività per *Brachyspira* spp. riscontrata in gruppi con meno di 20.000 soggetti e in gruppi più numerosi è stata pari al 49% (27/55) e al 21%

(4/19) rispettivamente. L'infezione non appare legata in modo statisticamente significativo alla numerosità del gruppo ( $P= 0.057$ ).

Al contrario è stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra infezione da *Brachyspira* spp. e sintomi enterici quali diarrea, aumento del contenuto idrico delle feci ed elevato numero di uova con guscio imbrattato ( $P = 0.022$ : 22/41 gruppi infetti con sintomi rispetto a 9/33 gruppi positivi senza sintomatologia).

Tra i 20 gruppi in cui veniva segnalato un calo dell'ovodeposizione, 13 (65%) sono risultati positivi rispetto ai 18/54 (33%) gruppi positivi in cui tale problematica non era stata osservata. Il calo di deposizione, che veniva segnalato in un intervallo variabile tra 3% e 9%, appare legato in modo statisticamente significativo all'infezione. Tale legame risulta ancor più rafforzato qualora vengano considerate solo le specie patogene per il pollame (*B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. alvinipulli*) ( $P= 0,002$ ). Per quanto riguarda il sistema di stabulazione, i risultati vengono riportati in tabella 2. I gruppi free-range e quelli allevati su pavimentazione fessurata sono apparsi maggiormente a rischio di contrarre l'infezione rispetto ai gruppi allevati in gabbia o voliera, ad eccezione di quelli ospitati in capannoni in cui viene utilizzato il raschiatore per l'allontanamento delle feci.

## DISCUSSIONE

Nel presente studio il 68,7% degli allevamenti di ovaiole analizzato è risultato positivo a *Brachyspira* spp. e il 46,8% a specie ritenute patogene per il pollame, confermando i dati acquisiti nel corso di una precedente indagine condotta in provincia di Treviso (Bano *et al.*, 2008).

Non sono state osservate differenze significative tra i risultati ottenuti impiegando i due differenti metodi diagnostici, anche se l'esame colturale ha permesso di risalire all'identificazione di specie in un numero superiore di campioni rispetto alla PCR diretta. La specie più frequentemente isolata è stata *B. innocens* (36,3%) seguita dalle due specie patogene *B. pilosicoli* (29,8%) e *B. intermedia* (23,4%). Tramite sequenziamento genico 2 ceppi sono stati identificati come *B. alvinipulli*, una specie patogena mai segnalata prima d'ora al di fuori degli Stati Uniti.

L'infezione da spirochete intestinali si conferma legata a disturbi dell'apparato gastroenterico che comportano sostanzialmente un aumento del contenuto idrico delle deiezioni e, di conseguenza, di uova con guscio imbrattato da feci. Tuttavia potrebbe risultare difficoltoso per i produttori associare un modesto incremento idrico nelle feci a tale patologia per 2 ragioni: innanzitutto perché l'aumento potrebbe essere causato da fattori legati alla composizione della razione e secondo perché la spirochetosi aviare è una patologia poco nota nel nostro paese, al contrario di quanto avviene in altri paesi ad avicoltura avanzata.

I risultati ottenuti sottolineano l'importanza economica della patologia che appare associata a un decremento della produzione di uova variabile tra il 3% e il 9%, in accordo con studi precedenti (Trampel *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1998). Tale associazione assume maggiore rilevanza in presenza di spirochete intestinali patogene, e ciò conferma l'importanza dell'identificazione di specie degli isolati a fini diagnostici

I gruppi d'età superiore alle 40 settimane hanno dimostrato un tasso d'infezione quasi doppio (54,7%) rispetto a gruppi più giovani (28,5%). Tale osservazione

è in accordo con studi precedenti e indica il fatto che il protrarsi della carriera produttiva espone il gruppo ad un rischio maggiore di contrarre l'infezione (Stephens e Hampson, 1999; Bano *et al.*, 2008).

La numerosità degli animali non appare legata in modo significativo all'infezione, anche se i gruppi più piccoli si sono dimostrati più frequentemente infetti (27/55) rispetto a quelli di dimensioni superiori (4/19). Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che solitamente i gruppi meno numerosi sono tenuti in condizioni d'allevamento più a rischio (free-range o allevamenti "a terra").

## CONCLUSIONI

In conclusione la colonizzazione di gruppi di ovaiole da parte di spirochete intestinali appare molto diffusa in Italia anche se risulta spesso sottodiagnosticata; ciò a causa dell'aspecificità dei sintomi e forse anche di una scarsa conoscenza della malattia. L'età avanzata dei gruppi e i sistemi di stabulazione a terra (su grigliato o free-range), espongono gli animali a rischi maggiori di contrarre l'infezione rispetto ai gruppi allevati in gabbia dove le deiezioni vengono allontanate con maggiore frequenza. Il presente studio conferma come la spirochetosi intestinale aviaria possa avere un impatto economico importante per l'allevamento della gallina ovaiole.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bano L., Merialdi G., Bonilauri P., Dall'Anese G., Comin D., Capello K., Cattoli G., Sanguinetti V., Agnoletti F. (2008). Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol.*, 37(3):281-286.
2. Calderaro, A., Merialdi, G., Perini, S., Ragni, P., Guegan, R., Dettori, G. & Chezzi, C. (2001). A novel method for isolation of *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae* from pigs with swine dysentery in Italy. *Veterinary Microbiology*, 80, 47-52.
3. Dwars R.M., Smit H.F., Davelaar F.G., Veer W., Van T. (1989). Incidence of spirochaetal infections in cases of intestinal disorder in chickens. *Avian Pathol.* 18, 591–595.
4. Dwar R.M., Davelaar F.G., Smit H.F. (1992). Influence of infection with avian intestinal spirochaetes on the faeces of laying hens. *Avian Pathol.* 21, 427–429.
5. Griffiths I.B., Hunt B.W., Lister S.A., Lamont M.H. (1987). Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with egg production in pullets. *Vet. Rec.* 121, 35–37.
6. La T., Phillips N. D., Hampson D. J. (2003). Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. *J Clin Microbiol.* 41(7): 3372–3375.
7. McLaren A.J., Trott D.J., Swayne D.E., Oxberry S.L., Hampson D.J. (1997). Genetic and phenotypic characterisation of intestinal spirochetes colonizing chickens, and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J. Clin. Microbiol.* 35, 412–417.
8. Nemes C. S., Glavits R., Dobos-Kovacs M., Ivanics E., Kaszanyitzky E., Beregszaszi A., L. Szeredi L., Dencso L. (2006). Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks. *Avian Pathol.*, 35(1):4-11.
9. Phillips N. D., La T., Hampson D. J. (2005). A cross-sectional study to investigate

- the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in three flocks of laying hens. *Veterinary Microbiology*, 105:189-198.
10. Rohde J., Rothkamp A., Gerlach G. F. (2002). Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel PCR – based restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 40: 2598-2600.
  11. Shivaprasad H. L., Duhamel G. E. (2005). Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial Turkeys. *Avian Dis.*, 49(1):609-613.
  12. Smith H.F., Dwars R.M., Davelaar F.G., Wijtten A.W. (1998). Observations on the influence of intestinal spirochaetosis in broiler breeders on the performance of their progeny and on egg production. *Avian Pathology*, 27, 133\_141.
  13. Swayne D.E., McLaren A.J. (1997). Avian intestinal spirochaetes and intestinal spirochaetosis. In: Hampson, D.J., Stanton, T.B. (Eds.), *Intestinal Spirochaetes in Domestic Animals and Humans*. CABI Press, Wallingford, pp. 267–300
  14. Swayne D.E., Bermudez A.J., Sagartz J.E., Eaton K.A., Monfort J.D., Stoutenberg J.W., Hayes J.R. (1992). Association of cecal spirochaetes with pasty vents and dirty eggshells in layers. *Avian Dis.* 36, 776–781.
  15. Trampel D.W., Jensen N.S., Hoffman L.J., 1994. Cecal spirochaetosis in commercial laying hens. *Avian Dis.* 38, 895–898.
  16. Weissenböck H. Maderner A., Herzog A. M., Lussy H., Nowotny N. (2005). Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet Mic*, 111:67-75.

	PCR dalle feci				Esame batteriologico			
	<i>Brachyspira</i> spp.		Specie patogene		<i>Brachyspira</i> spp.		Specie patogene	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
<b>Aziende</b>	22/32	68,7	12/32	37,5	22/32	68,7	15/32	46,8
<b>Capannoni</b>	35/74	47,2	18/74	24,3	31/74	41,9	20/74	27

**Tabella 1.** Aziende e capannoni risultati positivi per *Brachyspira* spp. e per spirochete patogene mediante PCR dalle feci ed esame batteriologico.

	<i>Gabbie con nastro</i>	<i>Fossa profonda</i>	<i>Gabbie con raschiatori</i>	<i>Gabbie UE</i>	<i>Pavimento fessurato</i>	<i>Free range</i>	<i>Lettieria convenzionale</i>
POS	9	2	4	0	8	9	0
NEG	21	4	0	5	7	4	1
TOT	30	6	4	5	15	13	1

**Tabella 2.** Positività a *Brachyspira* spp. in relazione al sistema di stabulazione/rimozione delle deiezioni adottato nel capannone

## EPISODI DI MENINGITE DA *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* NEL POLLO DA CARNE: ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI

Bano L.<sup>1</sup>, De Zan G.<sup>1</sup>, Viel L.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>, Fracas V.<sup>1</sup>, Vascellari M.<sup>2</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso

<sup>2</sup> IZS delle Venezie, Laboratorio di Istopatologia, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padova

### Summary

The present case report describes two meningoencephalitis outbreaks caused by *Riemerella anatipestifer* in commercial meat-chicken flocks. The disease appeared in 42-day-old birds and post-mortem, bacteriological, virological and histo-pathological examinations have been conducted. The pathogen has been isolated from brains of affected animals but not from septicaemic or serosal lesions. The two stains showed to be susceptible to the beta-lactamines and sulfonamides tested.

### INTRODUZIONE

*Riemerella anatipestifer* è un bacillo Gram-negativo, asporigeno, immobile, catalasi ed ossidasi positivo, causa di una grave malattia contagiosa tipica dell'anatra domestica che prende il nome di setticemia essudativa (1). In tale specie l'intervallo di maggiore suscettibilità all'infezione varia da 1 a 6 settimane di vita, mentre risulta rara nei riproduttori. Provoca ingenti perdite economiche nei sistemi di allevamento intensivo di anatidi, con elevata morbilità e mortalità variabile tra 5 e 50%. L'infezione può inoltre sporadicamente interessare l'oca, il tacchino ed il pollo (1). In quest'ultima specie le segnalazioni sono estremamente scarse tanto che negli ultimi 40 anni se ne contano solo 2: una in Australia e l'altra in Asia (2, 3).

Nell'anatra si ritiene che il patogeno, presente nell'ambiente, penetri nell'ospite attraverso le vie respiratorie o tramite lesioni traumatiche cutanee, soprattutto a carico del piede. Una volta entrata in allevamento, la patologia diventa endemica con andamento stagionale a trasmissione orizzontale (1). Dopo un'incubazione di 2-5 giorni si manifestano i segni clinici che comprendono depressione e atassia, scolo oculo-nasale, sintomatologia respiratoria, diarrea verdastra e sintomatologia nervosa terminale caratterizzata da tremori del capo e del collo che precedono il coma (1).

La lesione tipica negli anatidi è una diffusa poliserosite, maggiormente evidente su pericardio e fegato. Possono essere inoltre presenti meningite, necrosi del tessuto linfoide, frequente salpingite mucopurulenta o caseosa ed una forma d'infezione cronica localizzata che si manifesta a carico delle articolazioni o come dermatite necrotica del dorso ed in sede pericloacale (1).

In questo lavoro vengono descritti gli aspetti clinici e diagnostici di due episodi d'infezione da *Riemerella anatipestifer* del pollo da carne osservati in Italia nel corso del 2012 e 2013.

## **MATERIALI E METODI**

### *Anamnesi e sintomatologia*

Gli episodi di malattia si sono verificati a ottobre 2012 e gennaio 2013 in 2 distinti allevamenti di 20000 polli da carne Ross 308 stabulati su lettiera mista (truciolo e lolla di riso). Al momento della comparsa della sintomatologia neurologica entrambi i gruppi avevano 42 giorni ed in uno di questi era in corso da 2 giorni una terapia con sulfamidico e trimethoprim per pregressa forma respiratoria. La sintomatologia neurologica era caratterizzata da movimenti ritmici del capo (tremori), opistotono, decubito tarsale, perdita di equilibrio ed aveva interessato circa lo 0,5% degli animali. Tutti o parte dei sintomi sopra descritti erano presenti nei soggetti malati e potevano essere associati indifferentemente a una violenta forma eccitatoria o ad abbattimento del sensorio con ptosi palpebrale. La mortalità che fisiologicamente era dell'1% in entrambi gli allevamenti, si è mantenuta tale nell'allevamento in cui era in corso la terapia antibiotica mentre si è portata al 4% per una settimana nell'altro gruppo, dove si è deciso di intraprendere una terapia con amoxicillina. Cinque soggetti con sintomatologia neurologica del primo caso e 7 del secondo sono stati conferiti presso la Sezione Diagnostica di Treviso dell'IZS delle Venezie, qui sacrificati e sottoposti ad esame anatomopatologico e accertamenti diagnostici.

### *Esame batteriologico*

Accertamenti batteriologici sono stati eseguiti da organi/tessuti sede di lesioni evidenti e dal cervello di 3 soggetti sintomatici di ciascun gruppo.

Gli esami batteriologici da cervello sono stati eseguiti tramite accesso dal forame occipitale e il materiale encefalico prelevato è stato inoculato su Columbia agar (CA) e Agar sangue (AS). Le piastre di CA sono state incubate a 37 °C in condizioni di microaerofilia (CO<sub>2</sub> 10%) mentre quelle di AS sono state incubate alla stessa temperatura ma in aerobiosi. I terreni sono stati ispezionati dopo 24 e 48 ore. L'identificazione degli isolati è stata effettuata utilizzando lo strumento Microflex LT (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) equipaggiato con il software FlexControl (versione 3.3, Bruker Daltonics). La farmacosenibilità delle specie batteriche patogene per il pollo è stata saggiata tramite test di Kirby Bauer.

### *Accertamenti virologici*

Campioni encefalici prelevati nel corso del focolaio di ottobre 2012 sono stati sottoposti ad accertamenti virologici generici eseguiti tramite microscopia elettronica, isolamento su uova di pollo embrionate e su convenzionali linee cellulari.

I campioni encefalici sono stati inoltre analizzati tramite real-time PCR per avian paramyxovirus tipo 1 e virus influenzale tipo A. Dal siero di tutti i soggetti conferiti è stato condotto un esame sierologico in ELISA nei confronti del virus dell'encefalomielite aviare.

Nel primo caso clinico sono stati eseguiti anche accertamenti per bronchite infettiva tramite real-time PCR condotta su tampone tracheale di 1 soggetto con tracheite catarrale.

### *Accertamenti istopatologici*

Campioni encefalici prelevati da 1 soggetto sintomatico per gruppo, sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e sezionati a 4 µm. Sulle sezioni



ottenute è stata eseguita colorazione tramite ematossilina-eosina e i preparati sono stati esaminati al microscopio ottico.

## RISULTATI

All'esame anatomopatologico è stata osservata epatomegalia e pericardite fibrinosa e, nel caso clinico più recente, anche tracheite catarrale e artrosinovite purulenta a carico dell'articolazione tibio-tarso-metatarsale. Le lesioni sopra descritte erano presenti in alcuni soggetti mentre altri, seppur sintomatici, non presentavano alcuna lesione macroscopica.

Microscopicamente sono stati rilevati manicotti perivasali a carico dell'encefalo e meningite di tipo piogranulomatoso nel caso 1 e a prevalenza linfoistiocitaria o linfoide nel caso 2.

Gli accertamenti virologici e sierologici hanno dato tutti esito negativo, ad eccezione dell'esame per bronchite infettiva. Il ceppo virale individuato ha presentato al sequenziamento genico una similarità del 100% con la variante QX. I risultati degli accertamenti batteriologici vengono riassunti in tabella 1.

I ceppi di *Riemerella anatipestifer* isolati da entrambi i casi clinici hanno mostrato sensibilità ad ampicillina, amoxicillina-acido clavulanico, colistina, florfenicolo, sulfisoxazolo e sulfametossazolo associato a trimethoprim. Tetraciline, aminoglicosidi, fluorchinoloni di II generazione e i macrolidi testati hanno mostrata scarsa o nessuna efficacia *in vitro* nei confronti di uno o di entrambi i ceppi isolati da ciascun episodio.

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti portano alla diagnosi di meningoencefalite da *Riemerella anatipestifer* quale causa della sintomatologia neurologica osservata. Tale microrganismo è stato infatti isolato da tutti i campioni encefalici analizzati e da un prelievo eseguito da articolazione. Colpisce il mancato isolamento del patogeno da organi parenchimosi o sierose, che negli anatidi vengono considerati sede elettiva per l'esame colturale. Questo, se da un lato può trovare giustificazione dal trattamento farmacologico già in atto nel primo caso osservato, non è spiegabile nel secondo caso in cui gli animali non erano trattati al momento della comparsa della sintomatologia. L'essudazione fibrinosa osservata a livello delle sierose (pericardio e sacco aereo) e l'occasionale aumento di volume di fegato e milza erano forse attribuibili alla presenza di *E. coli* che è stato isolato da queste sedi.

L'unico isolamento extracerebrale è stato ottenuto dall'articolazione di 1 soggetto colpito da essudazione fibrino-purulenta. Tale localizzazione potrebbe essere avvenuta per via ascendente a partire da piccole soluzioni di continuo della cute del piede, come già descritto per gli anatidi (1).

Non è dato sapere se in prossimità dei focolai erano presenti allevamenti di anatidi, ma si sa che sicuramente a breve distanza vi erano allevamenti di tacchini da carne, specie nella quale *R. anatipestifer* viene isolata con maggiore frequenza rispetto al pollo.

## CONCLUSIONI

I casi clinici sopra descritti, osservati a distanza di pochi mesi l'uno dall'altro in 2 allevamenti diversi, fanno sospettare che l'infezione da *Riemerella anatipestifer*,

ritenuta malattia rara nel pollo, potrebbe aver inspiegabilmente aumentato la sua diffusione in questa specie nell'ultimo periodo. Sebbene la patologia risulti agevolmente controllabile tramite terapia antibiotica, è auspicabile saggiare la farmacosenibilità del ceppo implicato, al fine di prevenire l'insorgenza di ceppi multiresistenti che, con la loro diffusione, potrebbero causare pesanti perdite al settore avicolo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sandhu T. S., Rimler R. B. (1997). Infezioni da *Riemerella anatipestifer*. In: Calnek B. W. (Eds.), Diseases of poultry, Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 177-183.
2. Rosenfeld L. E. (1973). *Pasteurella anatipestifer* infection in fowls in Australia. Aust Vet J, 49: 55-56.
3. Li J. X., Tang Y., Gao J. Y., Huang C. H., Ding M. J. (2011). *Riemerella anatipestifer* infection in chickens. Pakistan Veterinary Journal, 31(1):67-69.

Caso	Soggetto	Organo/tessuto	Esito	
1	1	fegato	Negativo	
		pericardio	<i>Escherichia coli</i>	
	2	fegato	<i>Escherichia coli</i>	
		pericardio	Negativo	
	3	cervello	<i>Riemerella anatipestifer</i>	
		pericardio	<i>Escherichia coli</i>	
		milza	<i>Escherichia coli</i>	
		4	cervello	<i>Riemerella anatipestifer</i>
		5	fegato	Negativo
	2	3	pericardio	Negativo
cervello			<i>Riemerella anatipestifer</i>	
4		cervello	<i>Riemerella anatipestifer</i>	
		cervello	<i>Riemerella anatipestifer</i>	
5		sacco aereo	<i>Enterococcus cecorum</i>	
		pericardio	Negativo	
7		articolazione	<i>Riemerella anatipestifer</i>	

**Tabella 1.** Esito degli accertamenti batteriologici condotti

# APPLICAZIONE DELLA PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) PER LA CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS CECORUM* ISOLATI IN CORSO DI SPONDILITE VERTEBRALE DEL BROILER

Bano L.<sup>1</sup>, Pascoletti S.<sup>1</sup>, De Zan G.<sup>1</sup>, Cesca A.<sup>2</sup>, Moret C.<sup>1</sup>, Fagioni M.<sup>3</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>, Drigo I.<sup>1</sup>

1 IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso

2 Medico veterinario libero professionista, Treviso

3 Bruker Daltonics, Via Cluentina 26/R, 62100 Macerata

## Summary

*Enterococcus cecorum* is increasingly responsible for outbreaks of spondylitis in chickens worldwide. In order to investigate possible relatedness between strains isolated from osteomyelitis, 30 clinical relevant *E. cecorum* strains were processed by MALDI TOF and mass signatures compared by the principal component analysis (PCA). Results evidenced a low differentiation level between strains isolated intra-flock from bone lesions, leading the suspect that a clonal origin is on the base of the disease. Furthermore similar spectral patterns were observed in strains isolated in femoral and vertebral localizations from the same subject.

## INTRODUZIONE

*Enterococcus cecorum*, precedentemente denominato *Streptococcus cecorum*, è un cocco Gram-positivo, anaerobio facoltativo, catalasi-negativo, in grado di idrolizzare l'esculina (7).

Conosciuto come commensale intestinale del pollo adulto, negli ultimi anni è stato segnalato come causa di spondilite, con sempre maggiore frequenza, in diversi paesi, Italia compresa, risultando ormai un patogeno emergente e significativo del pollo da carne (1, 3, 4, 6, 7, 8, 10).

L'infezione si osserva più frequentemente in polli da carne d'età superiore a 28 gg, prevalentemente nel maschio, con possibilità di casi subclinici ed una mortalità che può raggiungere il 15% (1, 4, 5, 6, 8). La malattia è stata riprodotta con maggior successo attraverso somministrazione del patogeno per via orale rispetto a quella intravenosa (5).

Le lesioni macroscopiche risultano eterogenee e comprendono: ostemielite del femore ("necrosi della testa del femore"), artrite e tenosinovite e, meno frequentemente, pericardite/idropericardio (4, 6, 7). Tuttavia la lesione principale e caratteristica è la spondilite a carico della vertebra toracica mobile (T4) che causa stenosi del canale vertebrale e compressione midollare secondaria. Tale lesione è associata ad una tipica sintomatologia clinica caratterizzata da cifosi, stazione sui tarsi e paralisi degli arti. Microscopicamente si osserva un'ostemielite necrotizzante del corpo vertebrale di tipo fibrinoeterofilo, con presenza di cocci Gram-positivi (6, 8).

Nonostante la rilevanza clinica e commerciale di questa patologia, il ciclo d'infezione e la sua patogenesi risultano ancora largamente sconosciuti (6).

Per questa ragione studi recenti hanno indagato tramite genotipizzazione la possibile emergenza di un nuovo clone patogeno e le sue vie di trasmissione (2, 3, 4, 6, 9).

I risultati ottenuti tramite PFGE su ceppi isolati nel corso di malattia, hanno evidenziato come questi siano tra loro strettamente correlati, tanto da ipotizzare l'emergenza di un clone dotato di peculiare patogenicità (2, 3, 6). Inoltre i ceppi isolati da lesioni e quelli isolati dall'intestino dei rispettivi riproduttori sono risultati geneticamente distinti portando ad escludere una possibile trasmissione verticale (6).

In nessuno studio sono state prese in esame possibili correlazioni genetiche tra ceppi isolati da diversi siti di lesione in un medesimo soggetto infetto.

Scopo del presente lavoro è indagare, tramite principal component analysis (PCA), se esistono delle similitudini tra i profili spettrometrici di *E. cecorum*, tali da far ritenere che sussistano connessioni epidemiologiche tra ceppi isolati da soggetti distinti, affetti da spondilite vertebrale (come già confermato dagli studi di PFGE citati) o isolati da organi/distretti diversi dello stesso soggetto.

## **MATERIALI E METODI**

### *Ceppi batterici*

Tutti i ceppi erano stati isolati tra il 2010 e il 2013, identificati tramite sistema miniaturizzato API RAPID ID 32 Strep (Bio Merieux) o MALDI TOF (Microflex LT, Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) e conservati in criovials (Nalgene) a -80 °C.

In tutto sono stati sottoposti a PCA i profili spettrometrici ottenuti da 30 ceppi di *E. cecorum* isolati da 16 gruppi di broiler commerciali (Tabella 1). Di questi, 9 avevano presentato evidenti lesioni riferibili a spondilite vertebrale mentre negli altri 7 gruppi *E. cecorum* era stato isolato da organi parenchimosi (fegato, milza, polmone, rene), sierose (pericardio, sacco aereo) o articolazione tibio-tarsica.

In 7 gruppi il microrganismo era stato isolato da più di un soggetto. In 3 soggetti *E. cecorum* era presente sia a livello vertebrale sia femorale. Inoltre in 3 casi i ceppi provenivano dallo stesso allevamento ma erano stati isolati da gruppi diversi in momenti diversi.

### *Principal component analysis (PCA)*

Per l'esecuzione dello studio i ceppi sono stati scongelati su piastre di Columbia agar (Oxoid) incubate in condizioni di microaerofilia per 24 ore. I campioni sono stati sottoposti a protocollo di estrazione proteica che prevede l'utilizzo di acido formico 70% e acetonitrile. Ogni singolo ceppo è stato analizzato in 6 repliche.

Gli spettri da sottoporre all'analisi sono stati ottenuti con strumento Microflex LT (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) con software FlexControl (versione 3.3, Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati acquisiti automaticamente in linear positive mode con un range da 2 a 20000 m/z (massa/carica). Per la ionizzazione delle proteine batteriche d'interesse è stata impiegata come matrice una soluzione satura di HCCA ( $\alpha$ -Ciano-4-hydroxycinnamic acid, Bruker Daltonics) in 50% di acetonitrile e 2.5% di acido trifluoroacetico (TFA), come da indicazioni del produttore. Prima di procedere alla "clusterizzazione", lo strumento ha analizzato automaticamente gli spettri grezzi con il software MALDI Biotyper RT Classification (versione 3.1, Bruker Daltonics) confrontandoli con una libreria contenente 4613 spettri di referenza.

Gli spettri sono stati importati nel software MALDI Flex Analysis (versione

3.1, Bruker Daltonics) per essere comparati. Quelli considerati outlier tra quelli ottenuti dalle 6 diverse repliche sono stati eliminati. Gli spettri rimanenti sono stati elaborati quindi con software ClinProt tool 3.0 (Bruker Daltonics) che fornisce valori di varianza tra i diversi pattern spettrali fenotipici ottenuti, permettendo di disporre i ceppi in un dendrogramma.

## **RISULTATI**

Per ciascun ceppo le varie repliche hanno dato origine a spettri sostanzialmente simili tra loro, con l'esclusione mediamente di 1 solo profilo outlier per ceppo. In totale l'elaborazione è stata eseguita su 150 profili spettrometrici.

Gli spettri ottenuti dai vari ceppi inseriti nello studio hanno mostrato una varianza del 35%. In figura 2 viene riportato il dendrogramma ottenuto dall'elaborazione degli spettri tramite software. Dato che i ceppi sono risultati tra loro sostanzialmente omogenei, come dimostra il basso valore di varianza, si è deciso di porre arbitrariamente un cut-off di similarità pari a 5. In base a questo valore è possibile osservare la presenza di 3 cluster principali (figura 2). Tutti i ceppi isolati da lesioni ossee di soggetti appartenenti allo stesso gruppo, appaiono dispersi in uno di questi 3 cluster. Al contrario, ceppi isolati da uno stesso gruppo ma da organi/tessuti diversi da quello osseo, compaiono in 2 cluster diversi. Inoltre gli spettri ottenuti da ceppi isolati da spondilite vertebrale e da necrosi della testa del femore di uno stesso soggetto, presentano elevata similarità. In due dei tre allevamenti in cui la patologia si è ripresentata in gruppi diversi, sono stati isolati ceppi con pattern spettrali diversi tra loro. Tutti i ceppi isolati da lesioni vertebrali nel 2010 si collocano in un unico cluster (centrale).

## **DISCUSSIONE**

La varianza ottenuta dall'analisi delle componenti principali che caratterizzano gli spettri, è stata sostanzialmente bassa, indicando generalmente una stretta analogia tra i vari isolati. La diversa distribuzione dei ceppi isolati da organi/tessuti diversi, anche se da soggetti dello stesso gruppo, rispetto agli isolati da lesioni ossee, fanno sospettare che questi ultimi siano più simili tra loro rispetto a quelli che sporadicamente si isolano da altri distretti.

Infine anche i risultati ottenuti dall'analisi di ceppi isolati dai distretti ossei di uno stesso soggetto (femore e vertebra) lasciano supporre che il ceppo responsabile delle due lesioni sia lo stesso. I risultati ottenuti hanno confermato informazioni epidemiologiche relative a questa patologia, già acquisite con metodi di genotipizzazione consolidati come la PFGE (2, 3, 6). Si rende comunque necessaria una comparazione tra queste due metodiche sugli stessi ceppi per indagare l'attendibilità del metodo spettrometrico che, se confermato, consentirebbe di ridurre i tempi e la laboriosità che metodiche di genotipizzazione richiedono.

## **CONCLUSIONI**

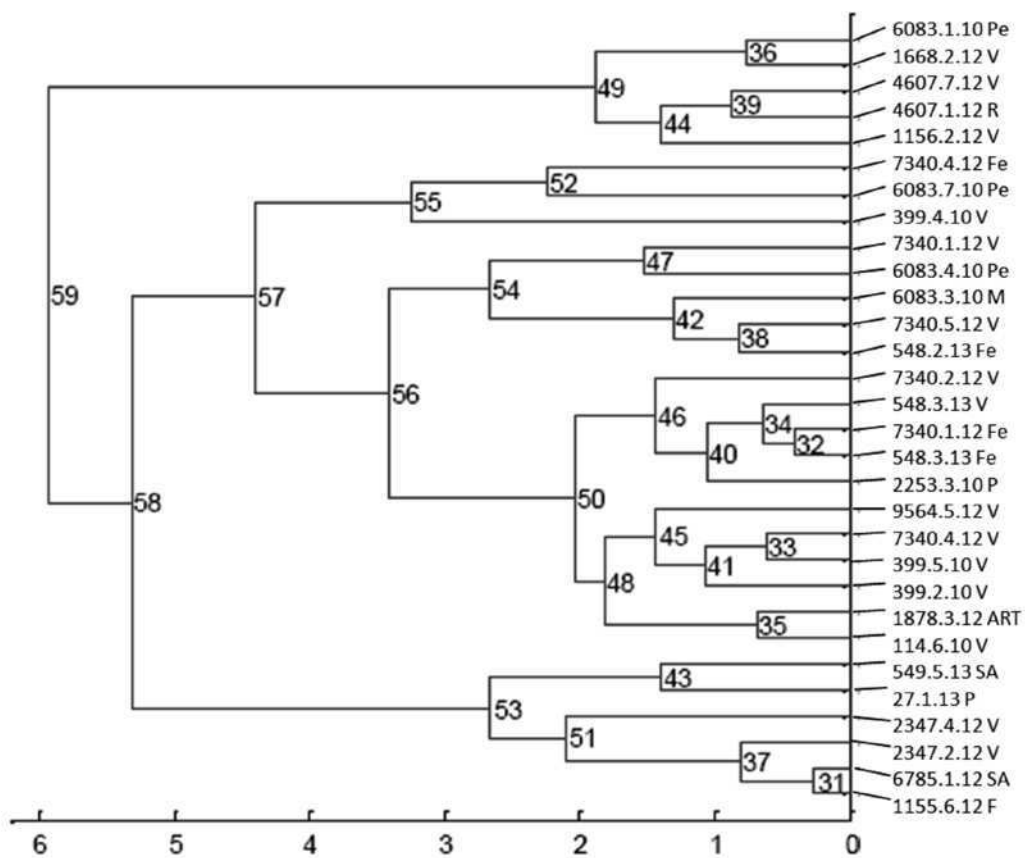
In conclusione la PCA sembrerebbe confermare i dati acquisiti in altri studi di epidemiologia biomolecolare realizzati su base genetica (PFGE), in cui è stata dimostrata una sostanziale clonalità dei ceppi isolati dai singoli episodi di spondilite del broiler (2, 3, 6). Tali risultati dovranno però essere confermati attraverso futuri studi comparativi tra PCA e PFGE eseguiti sugli stessi ceppi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bano L., Bonci M., Drigo I., Ferro T., Vascellari M., Cesca A., Agnoletti F. 2010. Spondilite da *Enterococcus cecorum* nel pollo da carne. Atti XLIX convegno SIPA, 29-30 Aprile, Forlì. Pp. 81-85.
2. Boerlin P., Nicholson V., Brash M., Slavic D., Boyen F., Sanei B., Butaye P. 2012. Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. *Veterinary Microbiology* 157: 405-411.
3. Borst L. B., Suyemoto M. M., Robbins K. M., Lyman R. L., Martin M. P., Barnes H. J. 2012. Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *AvianPathology* 41(5): 479-485.
4. Kense M.J., Landman W. J. M. 2011. Enterococcus cecorum infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *AvianPathology* 40(6): 603-612.
5. Martin L. T., Martin P. M., Barnes H. J. 2011. Experimental Reproduction of Enterococcal Spondylitis in Male Broiler Breeder Chickens. *Avian Disease* 55: 273-278.
6. Robbins K. M., Suyemoto M. M., Lyman R. L., Martin M. P., Barnes H. J., Borst L. B. 2012. Case Report - An Outbreak and Source Investigation of Enterococcal Spondylitis in Broilers Caused by *Enterococcus cecorum*. *Avian Disease* 56: 768-773.
7. Stalker M.J., Brash M. L., Weisz A., Ouckama R. L., Slavic D. 2010. Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22: 643-645.
8. Tahseen A., Barnes H. J. 2007. Is spondylitis an emerging disease in broiler breeders? *World Poultry* 23(12): 44-45.
9. Wijetunge D. S., Dunn P., Wallner-Pendleton E., Lintner V., Lu H., Kariyawasam S. 2012. Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(6): 1166-1171.
10. Wood A. M., MacKenzie G., McGillveray N. C., Brown L., Devriese L. A., Baele M. 2002. Isolation of *Enterococcus cecorum* from bone lesions in broiler chickens. *The Veterinary Record* 150(1): 27.

ID gruppo	Allevamento	Ibrido comm.	Incubatoio	Soggetto	Organo/Tessuto
114	A	Ross 708	A	6	Vertebra
			A	2	Vertebra
399	A	Ross 708		4	Vertebra
				5	Vertebra
2253	B	Kabir	D	3	Polmone
			C	1	Pericardio
6083	C	Ross 708		3	Milza
				4	Pericardio
				7	Pericardio
1155	D	Ross 708	C	6	Fegato
1668	E	Ross 708	A	2	Vertebra
1156	C	Ross 708	C	2	Vertebra
2347	F	Ross 308	B	2	Vertebra
				4	Vertebra
1878	G	Ross 308	B	3	Articolazione
4607	G	Ross 308	B	1	Rene
				7	Vertebra
6785	H	Hubbard	E	1	Sacco aereo
			A	1	Vertebra
7340	I	Ross 708		1	Femore
				2	Vertebra
				4	Vertebra
				4	Femore
				5	Vertebra
9564	L	Ross 308	C	5	Vertebra
27	M	Ross 708	A	1	Polmone
			M	2	Femore
548	N	Ross 308		3	Vertebra
				3	Femore
549	O	Ross 308	B	5	Sacco aereo

**Tabella 1. Lista dei ceppi inclusi nello studio**



**Figura 2.** Dendrogramma di ceppi di *E. cecorum* isolati da pollo



## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA ISOLATI RECENTEMENTE IN ITALIA

Bonci M.<sup>1</sup>, Giovanardi D.<sup>2</sup>, Pesente P.<sup>2</sup>, Morandini E.<sup>2</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>3</sup>, Rossi G.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 5 - 40064 Ozzano Emilia (BO) - ITALIA

<sup>2</sup> Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi, 5 - 37132 San Michele Extra, Verona - ITALIA

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), ITALIA

### Summary

Three non-vvIBDV strains detected in two broiler flocks were sequenced and compared to IBDV reference and Italian strains. The flocks, which belonged to two intensive farms located in Northern Italy, were vaccinated against IBDV and experienced recurrent bacterial infections and poor performances. Nucleotide sequence analysis of a 406bp-fragment of the genome, coding for the hypervariable region of VP2, revealed a homology of 100% between two of the strains and of 99% between them and the third one. Predicted amino acid sequences of the three strains were identical. When compared to classical, attenuated, very virulent and variant reference strains, as well as to Italian strains, they revealed to belong to a separate cluster. They showed a maximum degree of nucleotide and amino acid identity (95% and 95,6%, respectively) with only one IBDV strain, among those whose sequences are available in GenBank. At the amino acid level, the homology between the analyzed strains and published Italian strains ranged from 88% to 91%. Amino acid substitutions were observed in two of the hydrophilic peaks of VP2. Further studies are needed to evaluate the pathogenicity of these peculiar strains, their circulation in commercial broiler farms and the extent of protection offered against them by commercial IBDV vaccines.

### INTRODUZIONE

Il virus della bursite infettiva (IBDV) appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, all'interno del genere *Avibirnavirus*. E' un virus privo di envelope, a simmetria icosaedrica, con diametro compreso tra 55 e 65 nm. Si conoscono due sierotipi di IBDV: il sierotipo 1, che comprende ceppi classici, varianti e *very virulent* (vvIBDV), e il sierotipo 2, che raggruppa esclusivamente ceppi apatogeni. I ceppi varianti sono comparsi negli Stati Uniti a metà degli anni '80, eludono l'immunità di origine materna indotta da vaccini contenenti ceppi classici e provocano lesioni bursali non apprezzabili macroscopicamente. Indipendentemente dal grado di patogenicità del ceppo coinvolto e dalla gravità del quadro clinico, l'infezione da IBDV si accompagna sempre ad un danno a carico del tessuto bursale, e quindi ad immunosoppressione, più grave se gli animali sono colpiti nelle prime tre settimane di vita. Il genoma di IBDV è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento, rispettivamente di circa 3.300 (segmento A) e 2.900 (segmento B) pb. Il segmento A codifica per tre proteine strutturali (VP2, VP3 e VP4), prodotte sottoforma di un precursore unico che va incontro a clivaggio per dare origine alle tre singole proteine, e per una proteina non strutturale (VP5) che si ritiene abbia un ruolo

importante nella patogenesi. Il segmento B codifica per la polimerasi virale (VP1) (Etteradossi e Saif, 2008).

Tra le proteine strutturali la VP2, componente del capsido virale, è quella maggiormente studiata in quanto principale immunogeno di IBDV. La regione della VP2 compresa tra gli aminoacidi (aa) 206 e 350 del segmento A, definita "ipervariabile", comprende due picchi idrofili maggiori ( $P_{BC}$ , tra gli aa 212 e 224 e  $P_{HI}$ , tra gli aa 314 e 324) e due picchi idrofili minori ( $P_{DE}$ , tra gli aa 249 e 254 e  $P_{FG}$ , tra gli aa 279 e 289); i primi rappresentano gli epitopi neutralizzanti, mentre negli altri si localizzano aminoacidi che influenzano l'adattamento alle colture cellulari e la virulenza (Bayliss *et al.*, 1990; Coulibaly *et al.*, 2005). E' stato dimostrato che mutazioni di singoli aminoacidi della regione ipervariabile possono, a seconda della loro localizzazione, determinare l'elusione della risposta anticorpale indotta dalla vaccinazione, come accade per le varianti, o modificare il tropismo cellulare (Jackwood *et al.*, 1997; Brandt *et al.*, 2001; Jackwood *et al.*, 2008; Jackwood e Sommer-Wagner, 2011).

In Italia nell'ultimo decennio si è registrata la prevalente circolazione di vvIBDV, seguita dai ceppi classici. E' stata inoltre evidenziata la presenza di ceppi correlati a virus vaccinali e di ceppi che, pur essendo correlati coi ceppi classici, si distinguono chiaramente da questi (Moreno *et al.* 2007; Moreno *et al.*, 2010).

Obiettivi del presente studio sono stati: 1) valutare, mediante RT-PCR, la presenza di IBDV in gruppi di polli da carne che, pur non presentando un quadro clinico ed anatomopatologico palesemente riconducibile a bursite infettiva, erano caratterizzati da uno stato sanitario scadente e da prestazioni produttive inferiori a quelle attese, in allevamenti in cui tali problemi si ripresentavano da svariati cicli produttivi; 2) discriminare i ceppi riconducibili a vvIBDV dai non vvIBDV mediante *Restriction Enzyme Analysis* (REA); 3) sequenziare, nei soli ceppi non risultati vvIBDV, la regione ipervariabile della VP2, analizzarne la sequenza nucleotidica e la sequenza aminoacidica e confrontarle con le sequenze di IBDV pubblicate in *GenBank* e con quelle di ceppi italiani presenti in letteratura.

## MATERIALI E METODI

### *Gruppi campionati*

Sono stati oggetto del campionamento due gruppi di broiler (identificati come gruppo 1 e gruppo 2) appartenenti ad altrettanti allevamenti situati in due diverse regioni del nord Italia caratterizzate da un'elevata densità di aziende avicole. Entrambi i gruppi, il cui ciclo produttivo si è svolto nella primavera del 2011, erano stati oggetto di profilassi vaccinale nei confronti della bursite infettiva, con piani vaccinali diversificati che prevedevano l'uso di vaccini del commercio. Sia nel gruppo 1 che nel gruppo 2 si osservavano infezioni batteriche ricorrenti e ridotte *performance*.

### *Campionamento*

Il campionamento è stato effettuato: nel gruppo 1 a 21 e a 33 giorni d'età; nel gruppo 2 a 17 e a 36 giorni d'età. Ad ogni campionamento è stata prelevata la borsa di Fabrizio da 8 animali. I campioni sono stati processati in due pool di quattro borse ciascuno.

### *Estrazione dell'RNA virale*

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata con il kit del commercio QIAamp Viral RNA<sup>®</sup> (Qiagen) conformemente alle istruzioni della casa produttrice, a partire da omogenati di borse in *phosphate buffered saline* (PBS).

### *RT-PCR*

L'RT-PCR è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Jackwood *et al.* (2006), che consente di amplificare un frammento di 743pb del gene codificante per la VP2, situato nella regione ipervariabile della stessa.

### *Restriction enzyme analysis (REA)*

I prodotti dell'RT-PCR sono stati trattati con l'enzima di restrizione *SspI*, che riconosce la sequenza <sup>5'</sup>AAT ATT<sup>3'</sup> presente nei vvIBDV, all'interno della sequenza amplificata (Lin *et al.*, 1993, Jackwood e Sommer, 1999). La presenza della sequenza bersaglio fa sì che il prodotto dell'RT-PCR sia tagliato dall'enzima in due frammenti di 274 e 469pb ciascuno.

### *Sequenziamento e analisi di sequenza*

I prodotti amplificati che, in base all'esito della REA non risultavano appartenere a vvIBDV, sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) secondo le istruzioni della casa produttrice e sequenziati, in entrambe le direzioni, con il sequenziatore a capillari 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) presso Bio-Fab Research (Roma). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate, utilizzando il software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007), alle sequenze del gene della VP2 dei ceppi di IBDV di seguito indicati e presenti in *GenBank* (tra parentesi è indicato il numero di accesso alla sequenza): F52/70 (Y14958) e STC (D00499), rappresentativi dei ceppi classici; Int228E (AF457104), Cu1 (D00867) e D78 (Y14962), rappresentativi dei ceppi classici attenuati, Var-E (D10065) e Var-A (M64285) rappresentativi delle varianti statunitensi; DV86 (Z25482), OKYM (D49706), UK661 (X92760), 91168 (Y14957), 89163 (Y14956), 89224 (AJ001942), 849VB (X95883), BR1 (AY525106), 99323 (AJ583500) e GLS (Q82628), rappresentativi dei vvIBDV e con i ceppi IBDVRF-5/94 (Z97002) e UPM08SF2 (GQ131545). Le sequenze aminoacidiche sono state confrontate, oltre che con quelle dei ceppi summenzionati, con quelle di 16 ceppi italiani riportate da Moreno *et al.* (2007).

### *Analisi filogenetica*

Per selezionare il modello evolutivo più idoneo per la costruzione dell'albero filogenetico sono stati impiegati, rispettivamente per le sequenze nucleotidiche e per quelle aminoacidiche, i software *JModelTest* 2.1.2 (Darriba *et al.*, 2012) e *ProtTest* 3.2 (Darriba *et al.*, 2011) utilizzando come criterio di selezione il *Bayesian Information Criterion* (BIC). Gli alberi filogenetici sono stati quindi costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood col software PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010). I valori di *bootstrap*, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Il genoma di IBDV è stato evidenziato in entrambi i gruppi. In particolare: nel gruppo 1 è risultato positivo a RT-PCR un pool di borse prelevate a 21 giorni d'età; nel gruppo 2 sono risultati positivi un pool di borse prelevate a 17 giorni e i due pool di borse prelevate a 36 giorni d'età. Nessuno degli amplificati presentava il sito di restrizione che caratterizza i vvIBDV, perciò sono stati sequenziati e identificati come segue: ITA-01 (Gruppo 1, 21

giorni), ITA-02 (Gruppo 2, 17 giorni) e ITA-03 (Gruppo 2, 36 giorni: è stato sequenziato il prodotto della RT-PCR di un solo pool). L'analisi filogenetica è stata effettuata, per la sequenza nucleotidica, su una porzione di 406 nucleotidi compresa tra le posizioni 786 e 1191 del segmento A e, per la sequenza aminoacidica, su una porzione della VP2 di 136 aa, compresa tra l'aa 219 e l'aa 354 (numerazione secondo Bayliss *et al.* (1990)). I risultati dell'analisi filogenetica basata sulle sequenze aminoacidiche sono riportati nella figura 1.

Dall'analisi filogenetica risulta che i tre ceppi clusterizzano tra loro, ma formano un cluster distinto, sia a livello nucleotidico che a livello aminoacidico, rispetto ai ceppi di riferimento e a quelli analizzati da Moreno *et al.* (2007). Infatti tra ITA-01 e ITA-03 c'è un'identità nucleotidica del 100%, mentre tra questi e ITA-02 l'identità nucleotidica è del 99%, in quanto si differenziano per 3 basi nucleotidiche. Tali mutazioni sono tuttavia silenti in quanto l'identità aminoacidica fra i tre ceppi è del 100%. L'affinità nucleotidica dei ceppi analizzati coi ceppi di riferimento non supera il 92% e, tra le sequenze depositate in *GenBank*, quella che più si avvicina ad essi appartiene al ceppo IBDVRF-5/94 (similarità nucleotidica del 95% ed aminoacidica del 95,6%). Il confronto coi ceppi italiani, possibile sulla base della sola sequenza aminoacidica, in quanto la sequenza nucleotidica di tali ceppi al momento non risulta depositata in *GenBank*, evidenzia un grado di similarità compreso tra l'88% e il 91%.

Rispetto ai ceppi circolanti in Italia (Moreno *et al.*, 2007) i ceppi analizzati nel presente lavoro presentano delle differenze nella sequenza aminoacidica in posizione 220, 222, 253, 256, 258, 260, 269, 270; in comune con alcuni di essi presentano una serina in posizione 254, una treonina in posizione 270 e una serina in posizione 299. Alcune di tali mutazioni ricadono all'interno dei picchi idrofili  $P_{BC}$  (aa 212 – aa 224) e  $P_{DE}$  (aa 249 – aa 254), altre nelle immediate vicinanze degli stessi. Moreno *et al.* (2010) riportano che ceppi dotati di una mutazione in posizione 254 sono di sempre più frequente riscontro in Italia. Sulla base di studi condotti su ceppi Del-E (variante statunitense), Jackwood e Sommer-Wagner (2011) ipotizzano che mutazioni puntiformi in posizione 254 o in posizione 222 contribuirebbero, da sole, al fenomeno dell'*antigenic drift*.

## CONCLUSIONI

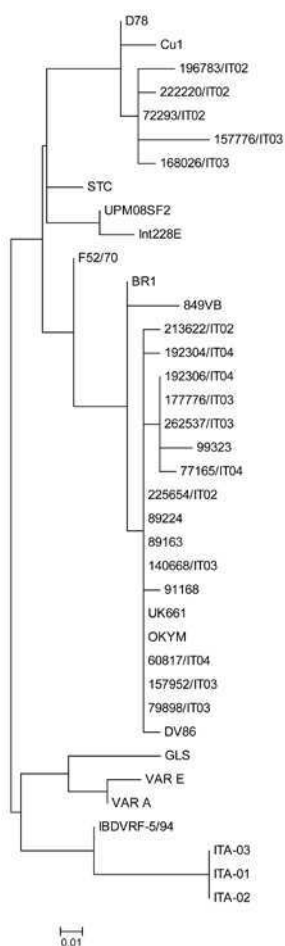
I ceppi di IBDV analizzati in questo studio presentano delle caratteristiche genomiche peculiari, ad oggi non segnalate in altri IBDV. Saranno condotti studi mirati a definirne la patogenicità e la protezione conferita, nei loro riguardi, dai vaccini di più comune impiego nella profilassi della bursite infettiva. Sarà inoltre opportuno estendere, possibilmente all'intero segmento A del genoma, la caratterizzazione molecolare di questi virus e confrontarli con altri ceppi di campo e con i virus vaccinali. Infine ulteriori studi in allevamenti intensivi potranno dare informazioni sulla diffusione di questi ceppi ed, eventualmente, contribuire a comprenderne l'epidemiologia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bayliss C.D., Spies U., Shaw K., Peters R.W., Papageorgiou A., Müller H., Boursnell M.E.G. (1990). A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71: 1303-1312.

2. Brandt M, Yao K., Liu M., Heckert R.A., Vakharia V. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75(24): 11974-11982.
3. Coulibaly F., Chevalier C., Gutsche I., Pous J., Navaza J., Bressanelli S., Delmas B., Rey F.A. (2005). The Birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell.* 120:761-772.
4. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.(2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27:1164-1165.
5. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
6. Eterradossi N., Saif Y. M. (2008). Infectious bursal disease. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson S.R., McDougald L.R., Nolan L.R., Swayne D.E. (Eds). *Diseases of Poultry 12<sup>th</sup> Edition* pp. 185-208.
7. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59(3):307-21.
8. Jackwood D.J. e Sommer S.E. (1999). Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis.* 43:310-314.
9. Jackwood D.J. e Sommer-Wagner S. E. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 409: 33-37.
10. Jackwood D.J., Jackwood R.J., Sommer S.E. (1997). Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant infectious bursal disease viruses. *Virus Res.* 49: 131-137.
11. Jackwood D.J., Cookson K.C., Sommer-Wagner S.E., Le Galludec H., De Wit J.J. (2006). Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis.* 50:532-536.
12. Jackwood D.J., Sreedevi B., LeFever L.J., Sommer-Wagner S.E. (2008). Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology* 377: 110-16.
13. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
14. Lin Z., Kato A., Otaki Y., Nakamura T., Sasmaz E., Ueda S. (1993). Sequence comparisons of highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis* 37:315-323.

15. Moreno Martin A., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Eterradossi N., Ceruti R., Cordioli P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious burdal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis.* 51: 863-872.
16. Moreno A., Barbieri I., Ceruti R., Morandini E., Cordioli P. (2010). Caratterizzazione genomica di ceppi del virus della malattia di Gumboro isolati in Italia nel periodo 2006-2009. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2010*, pp.199-203.



**Figura 1.** Albero filogenetico di ceppi di IBDV. L'albero è basato sulla sequenza aminoacidica di una porzione della regione ipervariabile del gene VP2 compresa tra l'aa 219 e l'aa 354, utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood col software PhyML 3.0. La barra rappresenta la distanza aminoacidica espressa come sostituzioni aminoacidiche per sito. Sono riportati solo valori di *bootstrap* > 70.

## SYNANTHROPIC BIRDS AND PARASITES

Borrelli L.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>, Russo T. P.<sup>1</sup>, Gargiulo A.<sup>1</sup>, Caputo V.<sup>2</sup>, Rosato G.<sup>2</sup>, Pepe P.<sup>1</sup>, Rinaldi L.<sup>1</sup>, Di Pineto L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali Università degli Studi di Napoli Federico II*; <sup>2</sup>*CRIUV Centro di Riferimento Regionale per l'Igiene Urbana Veterinaria ASL NA 1 Centro.*

### Summary

60 synanthropic birds were collected in the city of Napoli from April 2011 to March 2012. Each bird, often showing traumatic injuries, was necropsied and its alimentary tract was removed, divided into several segments, incised, scrapped and shaken in physiological saline. Parasitic infections were identified at post mortem examination in all synanthropic birds examined. These infections can lead to serious health problems when combined with other factors or at times of stress, and may affect flying performance and predatory or alimentary effectiveness as well as predisposing to secondary trauma.

### INTRODUZIONE

Il recente e progressivo inurbamento di alcune specie ornitiche che si riscontra sia in piccoli centri urbani che in metropoli è il risultato di una colonizzazione di spazi - del tutto simili a quelli naturali - dovuta a caratteristiche funzionali alle loro esigenze. Ogni specie tende a colonizzare un'area urbana attraverso un processo di adattamento quando le caratteristiche biotiche e abiotiche di quest'ultima lo richiedono (1). Il continuo rapporto con l'uomo di queste specie in ambiente urbano, risulta estremamente interessante dal punto di vista zooantropologico e per questo risulta inevitabile focalizzare l'attenzione anche sulle problematiche igienico-sanitarie che da esse ne derivano (1). I volatili sinantropici, infatti, dovrebbero essere considerati come dei possibili "serbatoi" di varie patologie, spesso a carattere zoonotico. Lo scopo del presente studio è quello di tracciare un quadro sulle principali infezioni parassitarie in uccelli sinantropici nella città di Napoli.

### MATERIALI E METODI

#### *Campionamento*

Sono stati esaminati 60 volatili sinantropici rappresentati da 20 gabbiani reali (*Larus michahellis*), 10 cornacchie grigie (*Corvus corone corone*), 15 colombi (*Columba livia*) e 15 gheppi (*Falco tinnunculus*). Gli esemplari sono pervenuti al Presidio Ospedaliero Veterinario (P.O.V.) dell'ASL Napoli 1 nel periodo Aprile 2011/Marzo 2012 in seguito a ritrovamenti e soccorsi nella città di Napoli dovuti ad inabilità al volo (90%), cachessia ed atassia.

#### *Isolamento e identificazione*

Su ciascun esemplare è stato condotto un esame necroscopico con maggiore

attenzione all'individuazione ed identificazione di ectoparassiti ed endoparassiti. L'indagine parassitologica è stata effettuata prima macroscopicamente sul contenuto intestinale, ed in seguito i singoli parassiti isolati sono stati visualizzati allo stereomicroscopio e conservati in alcool etilico al 70% in attesa della identificazione. I nematodi sono stati chiarificati con lattofenolo. I plattelminti sono stati colorati con la colorazione tricromica di Horen. I parassiti sono stati identificati secondo le chiavi e le descrizioni fornite da Anderson et al. (2).

## **RISULTATI**

All'esame esterno delle carcasse è stato riscontrato, nella maggior parte degli esemplari, presenza di ectoparassiti quali *mallofagi* (pidocchi masticatori), presenti in tutti gli animali (60/60); *Pseudolychia canariensis* (Hippoboscidae) definita anche "mosca piatta", riscontrata nel 80% (16/20) dei piccioni esaminati. Per quel che concerne gli endoparassiti sono stati ritrovati i parassiti intestinali di seguito elencati.

Nei Colombi: *Eimeria labbeana* (8/15); *Capillaria* (8/15); *Ascaridia columbae* (7/15); cestodi come *Railleitina tetragona* (5/15) e trematodi (5/15).

Nei Gabbiani: Trematodi come *Cardiocephalus longicollis* (11/20) e cestodi (10/20).

Nelle Cornacchie: Cestodi (5/10) e trematodi (3/10) in via di identificazione.

Nei Gheppi: Acanthocephali come *Centrorhynchus buteonis* (6/15) e *Centrorhynchus globocaudatus* (4/15) attaccati alla mucosa o liberi nel lume intestinale; Spirurida (*Physaloptera alata*) (3/15) nel proventricolo.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

I volatili sinantropici esaminati presentavano uno stato sanitario scadente e le parassitosi intestinali causavano quadri di enterite catarrale ed emorragica. L'alta percentuale (80%) di individui cachettici ed anemici è attribuibile al fatto che molti di questi soggetti pervenivano al P.O.V. feriti e con fratture esposte, spesso multiple e di vecchia data, condizioni che spesso non permettevano l'approvvigionamento di cibo. Il poliparassitismo riscontrato potrebbe aver influenzato e modificato lo stato di nutrizione dei volatili. L'azione dei parassiti va a completare il quadro necroscopico sulla base di una condizione immunitaria già compromessa da ferite, traumi di varia natura, subiti in ambiente urbano. A supporto di tali ipotesi, infatti, si riscontravano lesioni alla mucosa intestinale in tutti gli animali esaminati che inficiavano la digestione e i processi di assorbimento.

Va, inoltre, ricordato che *Cardiocephalus longicollis* è stato segnalato come potenziale agente di zoonosi (3, 4) e più di 100 adulti venivano raccolti dal piccolo intestino dei gabbiani esaminati nella ricerca.

Il controllo epidemiologico del sinantropismo rappresenta, quindi, una priorità nel garantire un adeguato livello di "prevenzione" sia per la protezione della fauna che per la salute pubblica.



## BIBLIOGRAFIA

1. Rodewald AD, Kearns LJ, Shustack DP. (2011) *Anthropogenic resource subsidies decouple predator-prey relationships*. *Ecol Appl.* 21(3):936-943.
2. Anderson RC, Chabaud AG, Willmott S. (1975) In: *CHI Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates.*, (Eds.), CAB International, Wallingford UK, pp. 463
3. Abdel-Aal AA, Soliman MFM, Shalaby IM (2004) Surface ultrastructure of *Cardiocephalus longicollis* (Digenea: Strigeidae) from Herring gull, *Larus argentatus* and its associated pathological lesions. *Helminthologia.* 41, 175-178
4. Defranceschi A, Fasola M, Grilli G, Ferretti E, Gallazzi D (2003) Stato Sanitario Di Una Popolazione Di Gabbiano Reale Nidificante Nelle Valli Di Comacchio. *J Mt Ecol, Suppl.* 7, 215-220.

## **CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DELL'ACQUISIZIONE DI RESISTENZA NEI CONFRONTI DI ENROFLOXACINA IN CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*.**

Catania S.<sup>1</sup>, Rodio S.<sup>1</sup>, Baldasso E.<sup>1</sup>, Gerchman I.<sup>2</sup>, Mikula I.<sup>2</sup>, Levisohn S.<sup>2</sup>  
Lysnyansky I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)

<sup>2</sup> Mycoplasma Unit, Department of Avian and Fish Diseases, Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel

### **ABSTRACT**

Minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial capable to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism *in vitro* cultivation. Mycoplasma species are important pathogens for poultry industry and particularly *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) can cause severe economic losses.

In Italy and in other European countries the incidence of MS seems to be increased. Moreover recent reports showed an increase of acquired resistance to enrofloxacin.

The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility of 73 MS isolates, isolated in different European Countries and Israel from different commercial poultry categories (broiler, layer, meat turkey, broiler breeder, turkey breeder) and to evaluate the mechanism of acquired resistance to enrofloxacin in these isolates. The biomolecular approach was used to study acquired resistance of MS field strains to enrofloxacin by characterisation of Quinolone Resistance-Determining Regions (QRDRs) known as sites accumulated mutations in fluoroquinolone resistant bacteria.

Our results showed high MICs values for enrofloxacin in the MS recent strains (2009-2012) in particular in the area where high density of poultry flocks is present. In addition, correlation between the MIC values and the mutations in the QRDR of *parC* gene was identified.

### **INTRODUZIONE**

Il *Mycoplasma synoviae* (MS) risulta essere uno dei micoplasmi aviari considerati importanti per il settore avicolo. La sua prevalenza nel settore avicolo europeo (1) e italiano risulta elevata, a fronte di un evidente contenimento delle problematiche relative al *Mycoplasma gallisepticum*. La sua elevata presenza nel settore produttivo determina non poche problematiche principalmente connesse a problemi articolari, respiratori e recentemente alla produzione di uova con guscio anomalo.

Sulla base di tale dati l'esigenza di trovarsi nelle condizioni di trattare un gruppo infetto, al fine di contenere le perdite economiche, non risulta così remota. I fluorochinoloni ed in particolare enrofloxacin, sono stati considerati un gruppo di farmaci di primo intervento in corso di micoplasmosi. Recentemente alcuni Autori hanno riportato un incremento della resistenza del *Mycoplasma synoviae*

nei confronti di tale molecola (2, 3), ancor più recentemente abbiamo potuto verificare l'elevata resistenza di ceppi di MS isolati sia dal territorio italiano che da altri stati europei (4).

L'acquisizione di resistenza nei confronti dei fluorochinoloni avviene principalmente attraverso la mutazione della regione denominata "Quinolone Resistance-Determining Regions" (QRDRs) del gene *parC* o *gyrA* (che codificano per la subunità A della DNA-girasi e per la topoisomerasi IV) e/o in alternativa dei geni *gyrB* o *parE* (che codificano per la subunità B della DNA-girasi e per la topoisomerasi IV). In particolare è stato riportato che a seguito di selezione *in vivo* la topoisomerasi IV (gene *parC*) sia target specifico per MS (5).

Sulle basi di tali dati abbiamo deciso di valutare in ceppi di *Mycoplasma synoviae* isolati in diverse regioni europee la presenza di particolari correlazioni tra le mutazioni nelle regioni "QRDRs" del gene *parC* e la concentrazione minima inibente rilevata *in vitro* secondo il calcolo della Minima Concentrazione Inibente attraverso il metodo delle microdiluizioni in brodo.

## MATERIALI E METODI

Un totale di 73 ceppi di *Mycoplasma synoviae* isolati tra il 1995 ed il 2012 sono stati analizzati nel presente studio. Di questi 44 ceppi sono stati isolati in Israele, 12 in Austria, 11 in Italia, 4 in Spagna e infine 2 ceppi in Belgio. Tutti i ceppi isolati provenivano da differenti categorie produttive quali riproduttori, broiler, tacchino e ovaioia.

Su tutti i ceppi è stata valutata la MIC attraverso un protocollo operativo interno seguendo le linee guida raccomandate da Hannan (6), il range di concentrazione testata variava da 0.03 µg/ml a 64 µg/ml. Abbiamo considerato come sensibili all'enrofloxina i ceppi con MIC ≤ 0.5 µg/ml, mentre gli isolati con MIC di 1 µg/ml sono stati classificati come intermedi ed infine come resistenti tutti i ceppi con MIC ≥ 2 µg/ml.

Tutti gli isolati sono stati sottoposti ad estrazione, di seguito il DNA ottenuto è stato utilizzato per la reazione di amplificazione. I *primers* utilizzati sono riportati in Tabella 1. Brevemente il ciclo di amplificazione utilizzato è stato il seguente: 3 minuti a 95°C; 30 cicli 95°C per 30 secondi; 60°C per 30 secondi; 72°C per 45 secondi e infine 72° C per 5 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati di seguito sequenziati presso l'unità di sequenziamento del Weizmann Institute (Rehovot, Israel) ed infine analizzati con DNASTAR software, versione 5.06/5.51, 2003 (Lasergene, Inc. Madison, Wisconsin, USA).

Inoltre tutti i ceppi testati sono stati classificati in gruppi secondo le caratteristiche geniche legate al gene *vlhA* (7).

## RISULTATI

Alcuni dei risultati del presente studio sono disponibili in forma schematica nei Grafici 1- 6.

Meno della metà degli isolati del presente studio hanno mostrato suscettibilità nei confronti della enrofloxacin con valori di MIC tra 0.03 e 0.5 µg/ml (Grafico 1). Gli isolati degli anni più recenti (2009-2012) hanno mostrato una minore antibiotico suscettibilità rispetto agli isolati degli anni passati (Grafico 2), tale dato

risulta molto evidente negli isolati di provenienza israeliana ed italiana (Grafico 3) i quali hanno mostrato valori di MIC superiori a **1 µg/ml**. L'unica eccezione a tale *trend* è stata evidenziata nei ceppi isolati in Austria dove la maggior parte dei ceppi testati mostravano una buona suscettibilità al farmaco (Grafico 4).

La valutazione delle mutazioni nel gene *parC* ha mostrato differenti sostituzioni amminoacidiche nelle posizioni 78, 80, 81 ed 84 (numerazione basata sull'*Escherichia coli*). Nei Grafici 5 e 6 sono riportati i risultati più evidenti. Infine è interessante far notare che i cambiamenti dimostrati in posizione 79, 81 ed 84 erano tutti presenti in ceppi di origine Israeliana, mentre le variazioni nella posizione 80 non presentano correlazioni con le aree geografiche di isolamento.

## CONCLUSIONI

Dai dati qui riportati si può notare come circa il 90% dei ceppi di MS isolati negli ultimi anni in Italia ed in Israele mostrano una minore suscettibilità *in vitro* per l'enrofloxacin.

Risulta essere particolarmente interessante notare che sebbene il *trend* di acquisizione di resistenza alla molecola sembrerebbe essere diffuso tra i vari Stati Europei, gli isolati provenienti dall'Austria sono in totale controtendenza. Tali differenze potrebbero essere ascritte ad un differente utilizzo di fluorochinoloni in tali aree, anche se a nostro parere risulta maggiormente importante l'organizzazione dell'industria avicola in questo Paese e di conseguenza la presenza o meno di aree altamente popolate di avicoli. Infatti si può ipotizzare che in aree ad alta vocazione avicola e ricche di aree densamente popolate quali Italia ed Israele, una disseminazione clonale di ceppi enrofloxacin-resistenti risulti essere molto più probabile rispetto a realtà zootecniche meno popolose come in Austria. Tale dato trova ulteriore conferma nei risultati di genotipizzazione, infatti i genotipi (*vlhA*) degli isolati austriaci risultano essere specifici dell'area.

Dall'analisi delle sequenze e quindi delle relative sostituzioni amminoacidiche in *parC* è **possibile evidenziare una correlazione** tra mutazioni in tale area e valori di MIC. In particolare tutti i ceppi classificati come sensibili all'antibiotico enrofloxacin non hanno mostrato cambiamenti nelle sopraccitate posizioni del gene *parC*. Mentre mutazioni singole o multiple hanno mostrato valori di MIC che permettevano di classificare gli isolati come intermedi o resistenti.

Naturalmente ulteriori studi, focalizzati su isolati di provenienza differente, sono necessari per avvalorare tale affermazione, ma sulla base dei nostri risultati possiamo affermare che l'analisi del gene *parC* può dare indicazioni utili riguardanti la possibile acquisizione di resistenza nei confronti dell'enrofloxacin.

TABELLA 1. *Primers* utilizzati

<i>Primer</i>	Gene target	Sequenza (5'-3')
MS-parC-F	<i>parC</i>	CCAACCGTGCAATTCCTGAT
MS-parC-R	<i>parC</i>	TTATGCGGCGGCATTTCG

Grafico 1. Valori di MIC riscontrati in tutti i ceppi analizzati

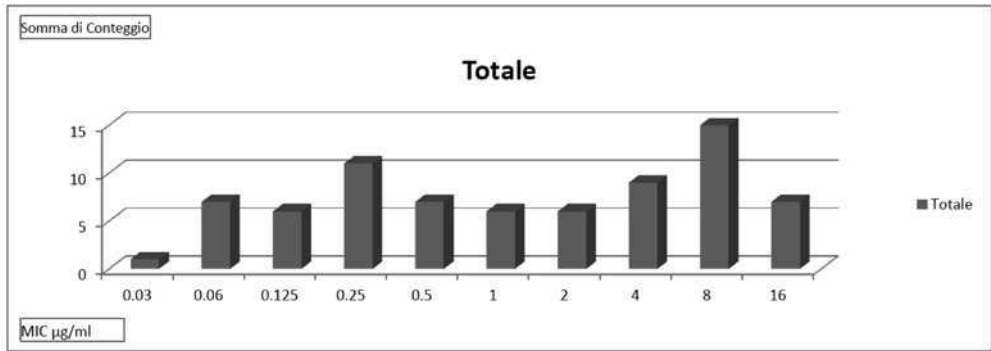


Grafico 2. Valori di MIC riscontrati nei ceppi isolati dal 2009 al 2012

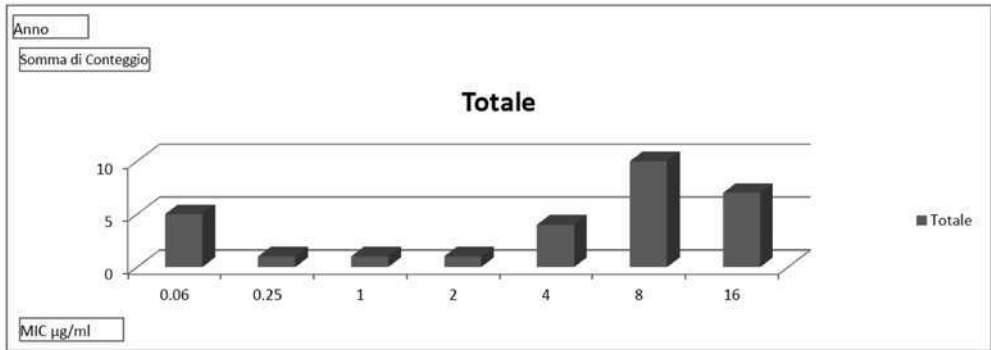


Grafico 3. Valori di MIC riscontrati nei ceppi isolati dal 2009 al 2012 In Italia ed in Israele

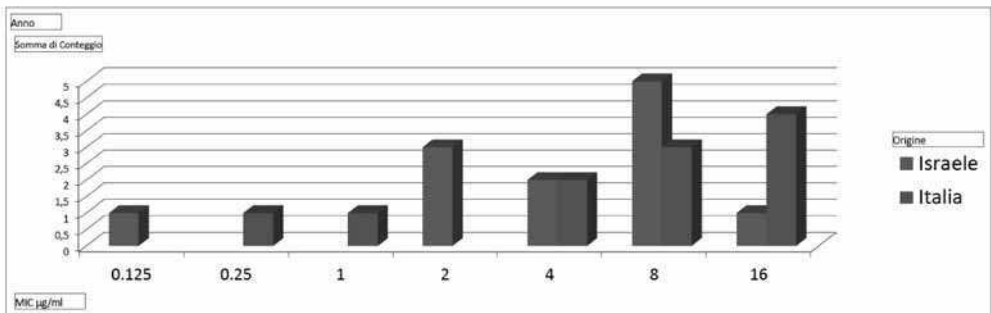


Gráfico 4. Valori di MIC riscontrati nei ceppi isolati dal 2009 al 2012 in Austria

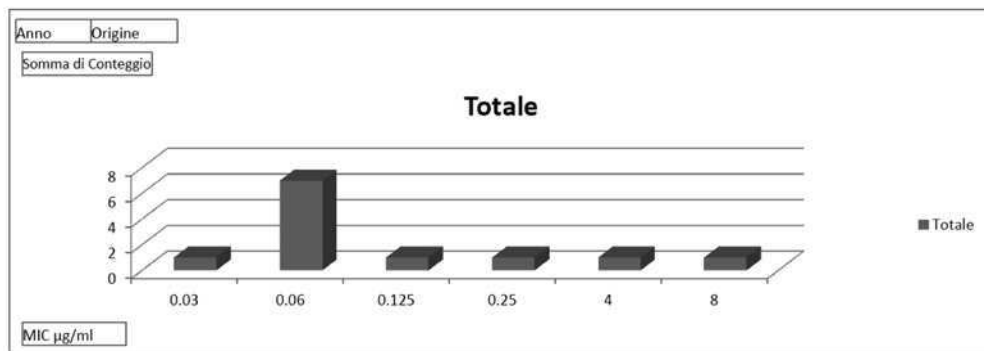


Gráfico 5. Valori di MIC riscontrati nei ceppi con sostituzione in posizione 80 con Ile o Ala

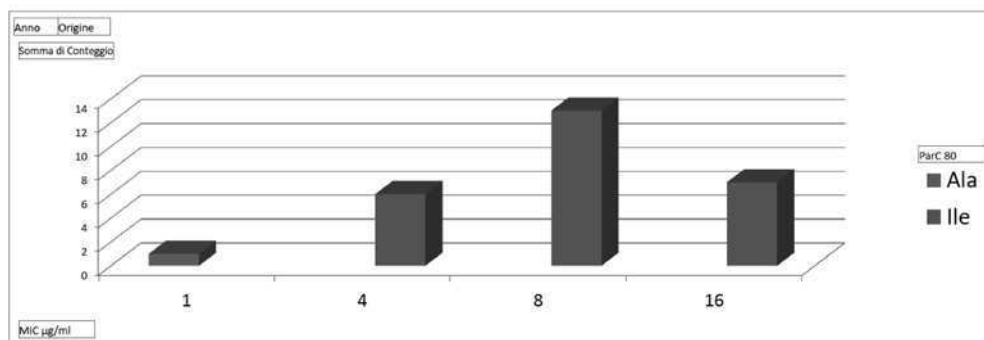
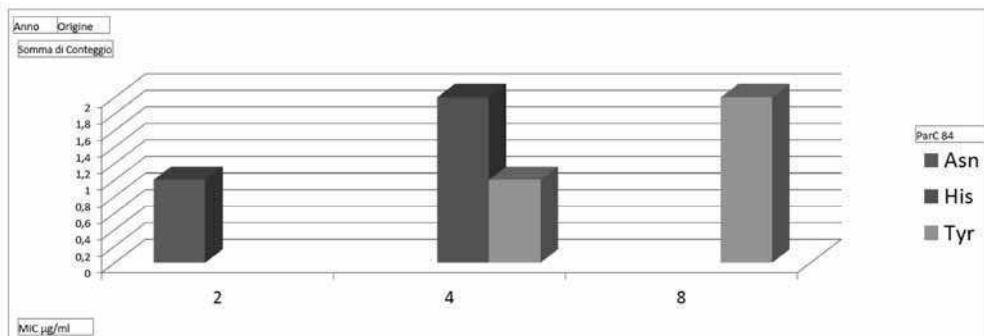


Gráfico 6. Valori di MIC riscontrati nei ceppi con sostituzione in posizione 84 con Asn, His o Tyr



## BIBLIOGRAFIA

1. A. Feberwee and W. J. M. Landman. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Control and Eradication in dutch Commercial Poultry. 19th International Congress of the IOM, 15-20 July 2012 Tolouse, France. Pag. 33
2. Dufour-Gesbert F, Dheilly A, Marois C, Kempf I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet Microbiol.* 2006 Apr 16;114(1-2):148-54. Epub 2005 Dec 9.
3. Landman WJ, Mevius DJ, Veldman KT, Feberwee A. In vitro antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry. *Avian Pathol.* 2008 Aug;37(4):415-20.
4. Gobbo F., Flaminio B., Fincato A., Baldasso E., Santone C., Catania S. *Mycoplasma synoviae* e concentrazione minima inibente: valutazione dell'antibiotico suscettibilità in funzione della categoria produttiva e del genotipo (Vlha). 51° CONVEGNO SOCIETA' ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE Salsomaggiore Terme, 11-12 ottobre 2012 –Pag. 281-286. Atti della Società Italiana di Patologia Aviare, 2012
5. Le Carrou, J., A. K. Reinhardt, I. Kempf, and A. V. Gautier-Bouchardon. 2006. Persistence of *Mycoplasma synoviae* in hens after two enrofloxacin treatments and detection of mutations in the *parC* gene. *Vet. Res.* 37:145-154.
6. Hannan P.C.T. (2000) Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.* 31:373-395.
7. Hammond PP, Ramirez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet Microbiol.* 2009 Apr 14;136(1-2):61-8

***Gli Autori ringraziano il Dr. J. Spargser, Institute of Bacteriology, Mycology and Hygiene, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria, per la gentile concessione degli isolati Austriaci.***

***Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 "Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole."***

## **INFEZIONE DA *POLYOMAVIRUS* IN NIDIACEI DI DIAMANTE DI GOULD (*ERYTHRURA GOULDIAE*)**

Circella E.\*, Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Bozzo G., Romito D., Camarda A.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”, S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari.

\*Elena Circella, +39 080 5443829/+39 080 5443910; e-mail: elena.circella@uniba.it

### **Abstract**

Le infezioni da *Polyomavirus* sono state riscontrate in diverse specie di mammiferi tra cui il cavallo, il bovino, il coniglio, i roditori e l'uomo (Perez-Losada et al. 2006; Renshaw et al. 2012; Wong and Xagorarakis, 2011; Groenewoud et al., 2010). Colpiscono inoltre i volatili (Johns and Müller, 2007). Al contrario di quanto accade nei mammiferi in cui le infezioni vengono riscontrate in soggetti immunodepressi, nei volatili *polyomavirus* è in grado di indurre in soggetti non immunocompromessi gravi quadri clinici, i cui aspetti possono variare in funzione dello stadio virale coinvolto e della specie colpita.

Nei pappagalli, *polyomavirus* è responsabile della BFD (Budgerigars Fledgling Disease) (Bernier et al. 1981; Bozemann et al., 1981), grave patologia riscontrata inizialmente nei pappagalli ondulati (*Melopsittacus undulatus*) in cui è ben nota, ma evidenziata nel corso degli anni in numerose altre specie di psittacidi in tutto il mondo (Katoh et al. 2010). Tale patologia è caratterizzata da elevati tassi di mortalità nei giovani e dall'insorgenza di anomalie distrofiche del piumaggio (Gerlach, 1994). Tra i volatili di interesse zootecnico, *polyomavirus* (GHPV - Goose Hemorrhagic Polyomavirus) è noto come l'agente eziologico della HNEG (Hemorrhagic Nephritis and Enteritis of Geese) (Guerin et al. 2000), malattia caratterizzata da improvvisa ed elevata mortalità dei giovani, con riscontro in sede necroscopica di enterite e nefrite necrotica-emorragica (Lacroux et al. 2004; Palya et al., 2004).

*Polyomavirus* è stato identificato inoltre nella taccola e, tra i fringillidi, nel cardellino, nel ciuffolotto e nel canarino.

In questo lavoro viene riportato un grave caso di infezione da *polyomavirus* in un allevamento in cui venivano allevate specie diverse di volatili, tutte appartenenti alla famiglia *Estrildidae*. In particolare, un'elevata mortalità dei novelli è stata osservata in un flock costituito da: 15 coppie di Diamante di Gould (*Erythrura gouldiae*), 15 coppie di Diamante codarossa (*Neochmia ruficauda*), 5 coppie di Diamante di Tanimbar (*Erythrura tricolor*), 2 coppie di Diamante guttato (*Stagonopleura guttata*), 2 coppie di Diamante variopinto (*Emblema picta*), 2 coppie di Diamante codalunga (*Poephila acuticauda*), 2 coppie di Diamante di Kittlitz (*Erythrura trichroa*), 8 coppie di Diamante pappagallo (*Erythrura psittacea*). Inoltre, erano presenti 50 coppie di Passeri del Giappone (*Lonchura striata domestica*), utilizzate come balie per allevare i piccoli di Diamante.

Durante un'intera stagione riproduttiva 120 nidiacei (88.8%) sono morti a circa 25 giorni di età, quando erano prossimi allo svezzamento, dopo aver manifestato negli ultimi 2-3 giorni di vita apatia, anoressia e, in alcuni casi, diarrea ricca di urati. La patologia ha interessato inizialmente i Diamanti di Gould e solo nelle settimane successive le altre



specie allevate. Nessun segno clinico è stato evidenziato negli adulti di Diamante e nei Passeri del Giappone. Il gruppo è stato trattato in acqua da bere senza alcun esito con amoxicillina/acido (500 mg/L) e successivamente con enrofloxacin (200 mg/L).

9 nidiacei (5 D. Gould, 2 D. guttati e 2 D. variopinti), morti a distanza di almeno 7 giorni dai trattamenti antibiotici, sono stati utilizzati per le indagini diagnostiche. Alla necropsopia, sono state osservate le seguenti lesioni: decolorazione del cuore e del fegato (Figure 1a), aumento di volume della milza, deposito di urati a livello renale (Figure 1b and 1c). Gli esami batteriologici a partire da fegato, milza, e sangue del cuore hanno escluso un'infezione batterica. Analogamente, gli esami parassitologici dal contenuto intestinale hanno escluso una parassitosi intestinale. Gli esami istologici effettuati su sezioni di fegato di 4 soggetti diversi (2 D. Gould, 1 D. guttato e 1 D. variopinto) hanno invece evidenziato la presenza di una elevata quantità di corpi inclusi intranucleari di tipo Cowdry B (figure 2), indice in questa sede di una attività replicativa di virus a DNA. Pertanto, i campioni di fegato sono stati sottoposti a PCR per *Circovirus* e *Polyomavirus*. Le indagini volte alla ricerca di *Circovirus* sono risultate costantemente negative; al contrario le PCR per *Polyomavirus* hanno consentito di ottenere un amplificato dell'ampiezza attesa (266 bp). Tale positività è stata confermata anche nei campioni di milza e contenuto intestinale. Tre amplificati ottenuti da campioni di fegato (rispettivamente di Diamante di Gould, di Diamante guttato e Diamante variopinto) sono stati clonati e sequenziati. Le sequenze analizzate mediante BLAST sono risultate tra loro identiche. Queste, inoltre, presentavano un'identità del 100% con la sequenza di Finch *Polyomavirus* (GenBank accession number DQ192571) identificato nel ciuffolotto (*Pyrrhula pyrrhula griseiventris*). Pertanto, il virus identificato è stato confermato come membro del genere *Avipolyomavirus*.

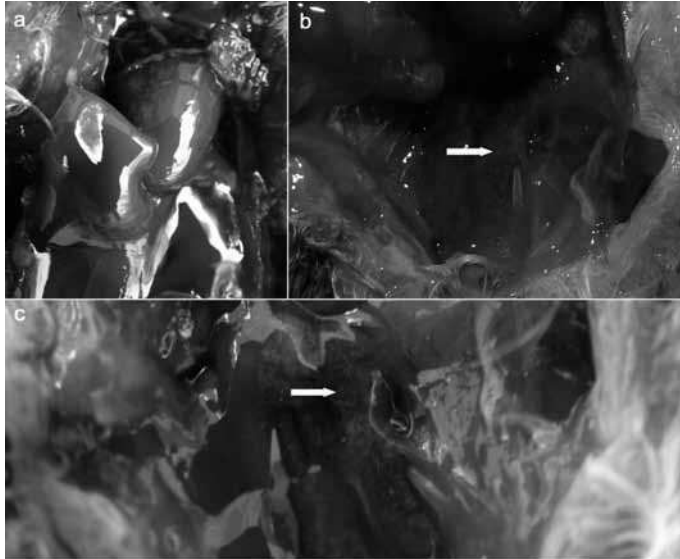
Quest'infezione tra gli *Estrildidi* era stata precedentemente segnalata solo una volta in un Diamante di Gould adulto, affetto da tumore delle cellule del Sertoli (Rossi et al. 2003). Pertanto, questo caso rappresenta la prima segnalazione di infezione associata ad elevata mortalità dei nidiacei in questa famiglia di volatili.

L'evoluzione del focolaio nel gruppo colpito ha mostrato similitudini con quanto riportato in caso di BFD nei pappagalli. Analogamente a quanto osservato nel caso descritto, in corso di BFD si osservano tassi di mortalità elevata e che possono raggiungere il 100% dei giovani, mentre gli adulti non presentano alcuna sintomatologia apparente. Inoltre, l'elevato accumulo di urati osservato nei nidiacei di Diamante esaminati richiama le glomerulonefriti che si riscontrano in corso di BFD nei pappagalli (Phalen et al. 1996; Gerlach et al. 1998).

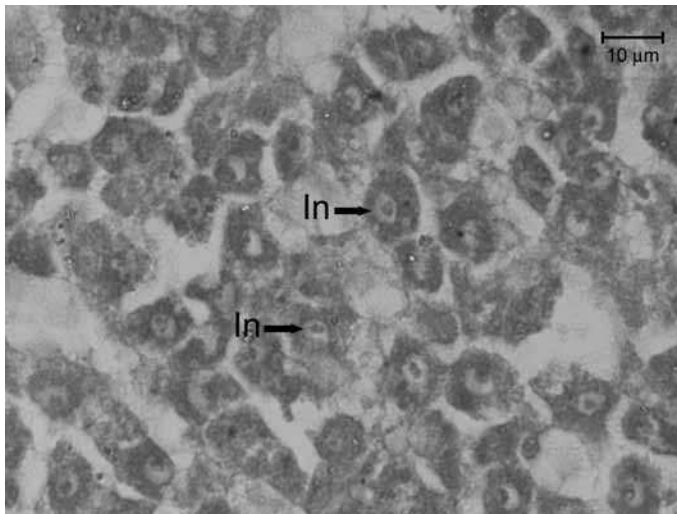
In altre specie di volatili non psittacidi, l'infezione è stata riscontrata in corso di coinfezione da *Salmonella* spp. nella taccola (*Corvus monedula*) (Johns et al. 2006) e da *Mycobacterium genavense* nel cardellino (*Carduelis carduelis*) (Manarolla et al., 2007). In questi casi, pertanto, il potenziale di patogenicità del virus risulta poco chiaro. Al contrario, *polyomavirus* è stato associato ad elevata mortalità dei nidiacei osservata per tre anni consecutivi in un flock di ciuffolotti (*Pyrrhula pyrrhula griseiventris*) (Johns et al., 2006) e ad elevata mortalità dei novelli intorno ai 40 giorni di vita nel canarino (*Serinus canaria*) (Halami et al., 2010).

Considerato il grave impatto che l'infezione può avere in un gruppo colpito e la mancanza di specifiche terapie, l'applicazione di corrette misure di profilassi diventa di estrema importanza. Tuttavia il vaccino, non disponibile in Italia, è registrato solo per i pappagalli e non vi sono dati relativi alla sua efficacia in specie diverse. Pertanto, una

misura efficace per ridurre il rischio di introduzione dell'infezione in un gruppo potrebbe essere lo screening in PCR di tutti i soggetti di nuova introduzione e dei riproduttori, considerando che gli adulti possono veicolare il virus asintomaticamente, eliminandolo nel gruppo attraverso le feci, gli urati, i secreti e per via verticale.



**Figura 1.** Lesioni macroscopiche. 1a: decolorazione del fegato e del cuore. E' presente solo il lobo destro del fegato in quanto il sinistro è stato prelevato per le indagini di laboratorio. 1b e 1c: accumulo di urati nel parenchima renale.



**Figura 2.** Sezione istologica di fegato. Corpi inclusi intranucleari Cowdry B (In) (freccie nere). Ematossilina-eosina. Ingrandimento 1000x.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bernier G, Morin M, Marsolais G. (1981). A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papova-like agent. *Avian Dis.* 25:1083-1092.
2. Bozemann LH, Davis RB, Gaudry D, Lukert P.D., Fletcher O.J., Dykstra M.J. (1981). Characterisation of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis.* 25:972-980.
3. Gerlach H, Enders F, Casares M, Müller H., Johne R., Hanichen T. (1998). Membranous glomerulopathy as an indicator of avian polyomavirus infection in Psittaciformes. *J Avian Med Surg.* 12:248-254.
4. Gerlach H. Polyomavirus. In: Ritchie BW, Harrison J, Harrison LR, eds. *Avian medicine: principles and application.* (1994). Wingers Publishing, Lake Worth, pp. 888–902.
5. Groenewoud MJ, Fagrouch Z, van Gessel S, Niphuis H., Sasnauskas K., Warren K.S., Heeney J.L., Verschoor E.J. (2010). Characterization of novel polyomaviruses from Bornean and Sumatran orangutans. *J Gen Virol.* 91:653-658.
6. Guerin JL, Gelfi J, Dubois L, Vuillame A., Boucraut-Baralon C., Pingret J.L. (2000). A novel polyomavirus (goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of hemorrhagic nephritis of geese. *J Virol.* 74:4523-4529.
7. Halami MY, Dorrestein GM, Couteel P, Heckel G., Müller H., Johne R. (2010). Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *J Gen Virol.* 91:3016-3022.
8. Johne R, Müller H. (2007). Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J Virol.* 81:11554-11559.
9. Johne R, Wittig W, Fernandez-de-Luaco D, Höfle U., Müller H. (2006). Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J Virol.* 80:3523-3531.
10. Katoh H, Ogawa H, Ohya K, Fukushi, H. (2010). A review of DNA viral infections in psittacine birds. *J Vet Med Sci.* 72:1099-1106.
11. Lacroux C, Andreoletti O, Payre B, Pingret J.L., Dissais A., Guerin J.L. (2004). Pathology of spontaneous and experimental infections by goose hemorrhagic polyomavirus. *Avian Pathol.* 33:351-358.
12. Manarolla G, Liandris E, Pisoni G, Moroni, P., Piccinini, R., Rampin, T. (2007). Mycobacterium genavense and avian polyomavirus co-infection in a European Goldfinch (*Carduelis carduelis*). *Avian Pathol.* 36:423-426.

13. Palya V, Ivanics E, Glávits AD, Mátó T., Zarka P. (2004). Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis virus infection of geese. *Avian Pathol.* 33:244-250.
14. Perez-Losada M, Christensen RG, McClellan DA, Adam BJ, Viscidi RP, Demma JC, Crandall KA. (2006). Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts. *J Virol.* 80:5663-5669.
15. Phalen D.N., Wilson V.G., Graham D.L. (1996). Characterization of the avian polyomavirus-associated glomerulopathy of nestling parrots. *Avian Dis.* 40: 140-149.
16. Renshaw RW, Wise AG, Maes RK, Dubovi E.J. (2012). Complete genome sequences of polyomavirus isolated from horses. *J Virol.* 86:8903.
17. Rossi G, Ceccherelli R, Piersigilli A, Tarantino C. (2003). Sertoli cell tumor with polyomavirus infection in a Gouldian finch (*Erythrura gouldiae*). *Avian Dis.* 47:240-3.
18. Wong K, Xagorarakis I. (2011). Evaluating the prevalence and genetic diversity of adenovirus and polyomavirus in bovine waste for microbial source tracking. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011:90:1521.

## ANTIBIOTICO-RESISTENZA E INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE COMMERCIALI

Dotto G.<sup>1</sup>, Giacomelli M.<sup>1</sup>, Giovanardi D.<sup>2</sup>, Franciosini M.<sup>3</sup>, Grilli G.<sup>4</sup>, Piccirillo A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova. Viale dell'Università, 16 - 35020, Legnaro (Padova).

<sup>2</sup> Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5 - 37132 San Michele Extra (Verona).

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università degli Studi di Perugia. Via San Costanzo, 4 - 06126 Perugia.

<sup>4</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università di Milano. Via Celoria, 10 - 20133 Milano.

### Summary

A total of 355 *E. coli* were analyzed to determine the phenotypic and genotypic (*i.e.* class 1 and 2 integrons) antimicrobial resistance (AMR). Strains were tested by the disk diffusion method according to CLSI (2006) standard against 21 antimicrobial drugs belonging to 8 classes. Class 1 and class 2 integrons were detected by PCR as described by Lévesque *et al.* (1995) and White (2001), slightly modified. Gene cassettes content was characterized by DNA sequencing. Phenotypic AMR results were: 90.4% of isolates resistant to tetracycline, followed by 85.9% to ampicillin, 80.6% to doxycycline, 80.3% to triple sulphonamides, 74.4% to nalidixic acid, 67% to streptomycin, 63.9% to trimethoprim/sulfamethoxazole, 50.1% to cephalothin, 40.3% to chloramphenicol, 31% to enrofloxacin, 25.1% to amoxicillin/clavulanic acid, 24.5% to norfloxacin, 23.9% to ciprofloxacin, 16.9% to kanamycin, 16.1% to gentamicin, 15.2% to ceftiofur, 9% to cefotaxime, 5.1% to ceftazidime, 3.4% to apramycin, 2.8% to colistin, and 1.4% to florfenicol. Both class 1 and class 2 integrons were found: 36% of strains carried class 1 integrons, 9% class 2 integrons and 3.4% both classes. Gene cassettes were mainly *aadA*, *sat*, *dfrA* and their variants, alone or in combination; whereas *orfF* and *estX* genes were more rarely detected. These genes confer resistance to aminoglycosides (*i.e.* streptomycin, streptothricin, and spectinomycin) and trimethoprim. AMR and integrons seems to be common among *E. coli* from poultry. Integrons represent important contributors in the dissemination of AMR.

### INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza è il risultato di un complesso processo multifattoriale supportato da una serie di elementi genetici mobili capaci di veicolare e trasferire determinanti di resistenza. Il trasferimento orizzontale di materiale genetico tra batteri è un fenomeno particolarmente diffuso e piuttosto comune nell'ecologia dei batteri, soprattutto nei gram-negativi (Stokes & Hall, 1989). Esistono diverse strutture genetiche spesso tra loro correlate, in grado di promuovere l'acquisizione e il trasferimento tra batteri di *cluster* di geni di resistenza agli antimicrobici, in particolare plasmidi, trasposoni e integroni (Carattoli, 2001).

Gli integroni sono strutture genetiche in grado di acquisire, integrare ed esprimere geni contenuti in cassette mobili, definiti geni-cassetta. Ad oggi sono state

descritte molte cassette geniche codificanti resistenze verso diversi antimicrobici, in particolare aminoglicosidi,  $\beta$ -lattamici, trimethoprim e cloramfenicolo (Mazel, 2006). Queste strutture contengono tre componenti funzionali: i) il gene *intI*, che codifica per un enzima, l'integrasi, facente parte della famiglia delle tirosin-ricombinasi sito-specifiche che catalizza l'inserimento delle cassette geniche nel ii) sito di ricombinazione *attI*, e iii) un promotore responsabile dell'espressione dei geni-cassetta inseriti (Carattoli, 2001). In base alla sequenza del gene *intI* codificante per l'integrasi, si distinguono diverse classi di integroni, caratterizzate da differenze sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Tuttavia, le classi più diffuse e meglio caratterizzate sono le prime due e sembrano essere quelle maggiormente coinvolte nella diffusione dell'antibiotico-resistenza tra batteri, sia gram-positivi, sia gram-negativi (Carattoli, 2001; Mazel, 2006).

Lo scopo del presente studio è di determinare i profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza di ceppi di *E. coli* commensali (AFEC) e patogeni (APEC) isolati da volatili d'allevamento, con particolare riguardo alla ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2.

## MATERIALI E METODI

### *Ceppi batterici*

L'indagine è stata condotta su un totale di 355 ceppi di *Escherichia coli*, di cui 188 isolati da tacchini da carne (158 APEC e 30 AFEC), 110 da broiler (APEC) e 57 da galline ovaiole (31 APEC e 26 AFEC) provenienti da allevamenti avicoli industriali del Centro e Nord Italia, raccolti tra il 2008 e il 2012.

### *Determinazione dell'antibiotico-resistenza fenotipica*

La valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche è stata eseguita utilizzando il metodo di diffusione in piastra di Kirby-Bauer (1966), secondo la procedura raccomandata dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Sono state testate 21 molecole antimicrobiche appartenenti a 8 classi: aminoglicosidi (apramicina 15  $\mu$ g, APR; kanamicina 30  $\mu$ g, K; gentamicina 10  $\mu$ g, GM; streptomina 10  $\mu$ g, STR); fluorochinoloni (acido nalidixico 30  $\mu$ g, NA; ciprofloxacina 5  $\mu$ g, CIP; enrofloxacin 5  $\mu$ g, ENR; norfloxacina 10  $\mu$ g, NOR); tetracicline (doxiciclina 30  $\mu$ g, DO; tetraciclina 30  $\mu$ g, TET); sulfamidici potenziati (trisulfamidico 300  $\mu$ g, S3; sulfametossazolo + trimethoprim 25  $\mu$ g, SXT); fenicoli (cloramfenicolo 30  $\mu$ g, CAF; florfenicolo 30  $\mu$ g, FFC); penicilline (ampicillina 10  $\mu$ g, AM; amoxicillina + acido clavulanico 30  $\mu$ g, AMC); cefalosporine (cefalotina 30  $\mu$ g, CF; ceftiofur 30  $\mu$ g, CFT; cefotaxime 30  $\mu$ g, CTX; ceftazidime 30  $\mu$ g, CAZ); polimixine (colistina 10  $\mu$ g, CT). I risultati sono stati interpretati secondo i criteri stabiliti per le *Enterobacteriaceae* dal CLSI (CLSI, 2002, 2006, 2007) e dalla *Société Française de Microbiologie* (SFM, 2011), ad eccezione delle molecole APR ed ENO la cui valutazione è stata eseguita secondo i *breakpoint* forniti dalla ditta produttrice. La qualità è stata verificata utilizzando *E. coli* ATCC 25922 come controllo.

### *Estrazione del DNA*

I campioni sono stati sottoposti a estrazione del DNA batterico utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics

Corporation, Marnes La Coquette, Francia), seguendo il protocollo indicato dalla ditta produttrice.

#### *Rilievo degli integroni di classe 1 e 2*

Il DNA di ogni campione è stato sottoposto ad amplificazione della regione variabile utilizzando i *primer* decritti rispettivamente da Lévesque *et al.* (1995) e White (2001). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Monza, Italia) in un volume finale di 50  $\mu$ l. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando la *High Fidelity Taq DNA polymerase* (Applied Biosystems). La miscela di reazione era composta da 1X *Buffer*, 0.2 mM di ciascun nucleotide trifosfato, 2 mM di  $MgSO_4$ , 0,5  $\mu$ M di ciascun *primer*, 1 U di *HF Platinum® Taq DNA polymerase* e 100 ng di DNA estratto. Il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di *annealing* a 55°C per 30 secondi ed una di estensione a 68°C per 5 minuti, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 94°C per 2 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 5 minuti. A ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo e un bianco di reazione. I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (w/v) in *Buffer TBE 1X* (Tris 90 mM, acido borico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) con l'aggiunta di 0.1  $\mu$ l/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italia). Le bande sono state visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc™ XR* (BioRad, Segrate, Italia) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica è stato aggiunto il marcatore di peso molecolare *DNA Ladder 100 bp* (Genespin, Milano, Italia).

#### *Caratterizzazione dei geni cassetta*

Prima di procedere al sequenziamento nucleotidico, i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Clean-up Micro Kit* (Roche Diagnostic Corporation) secondo le specifiche fornite dalla ditta produttrice e quindi sottoposti a corsa elettroforetica. Gli amplificati purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando il kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems) secondo il protocollo descritto dalla ditta produttrice e gli stessi *primer* usati per l'amplificazione. I prodotti di reazione sono stati sottoposti a elettroforesi capillare con lo strumento *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute sono stati letti separatamente e poi assemblati al fine di ottenere una sequenza consenso. L'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi sono stati eseguiti utilizzando il *software ChromasPro*, v1.42 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). È stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze consenso con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il programma BLAST. In questo modo è stato possibile definire le cassette geniche contenute nella regione variabile di ciascun integrone.

## **RISULTATI**

#### *Profili di antibiotico-resistenza*

Le resistenze più elevate sono state riscontrate nei confronti di tetracicline, sulfamidici, chinoloni di prima generazione e di alcuni  $\beta$ -lattamici e aminoglicosidi

(Tabella 1). Per quanto riguarda le tetracicline, il 90,4% dei ceppi è risultato resistente alla tetraciclina e l'80,6% alla doxiciclina. Livelli di resistenza simili sono stati riscontrati anche nei confronti dell'ampicillina (85,9%), del trisulfamidico (80,3%) e dell'acido nalidixico (74,4%). Anche se più contenute, sono state inoltre evidenziate resistenze nei confronti della streptomina (67%), del sulfametossazolo/trimetoprim (63,9%), della cefalotina (50,1%), del cloramfenicolo (40,3%) e dell'enrofloxacin (31%). Le sensibilità più elevate sono state invece riscontrate nei confronti del florfenicolo (91,8%) e della colistina (90,1%), della maggior parte degli aminoglicosidi (ad eccezione della streptomina) dove percentuali di ceppi del 49,6%, 80,3% e 96,1% hanno mostrato sensibilità alla kanamicina, alla gentamicina e all'apramicina, alle cefalosporine ceftazidime (91,5%), cefotaxime (77,2%) e ceftiofur (62,5%) e alla combinazione dell'amoxicillina con l'acido clavulanico (60,8%). Per quanto riguarda i chinoloni, invece, i livelli più elevati di sensibilità sono stati evidenziati nei confronti delle molecole di seconda generazione norfloxacin (69,9%) e ciprofloxacina (62%).

#### *Presenza e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2*

Il 36% dei campioni (128/355 ceppi) è risultato positivo agli integroni di classe 1, mentre il 9% (32/355 ceppi) alla classe 2. Di questi, 12 (3,4%) erano positivi ad entrambe le classi (Tabella 2). Le dimensioni delle regioni variabili erano comprese tra poche centinaia di basi (500-600 pb) e 2000 pb e le cassette geniche riscontrate più di frequente erano *aadA*, *sat*, *dfrA* e loro varianti, singole o in combinazione tra loro, codificanti rispettivamente per gli enzimi *dihydrofolate-reductase*, *aminoglycoside 3' adenylyltransferase* e *streptothricin acetyltransferase* responsabili della resistenza ad alcuni aminoglicosidi (streptomina, spectinomina e streptotricina) e al trimetoprim. Oltre a questi geni, sono state riscontrate, seppur in un numero limitato di ceppi, anche le cassette *orfF* ed *estX* codificanti per ipotetiche proteine la cui funzione tuttavia non è ancora conosciuta. È inoltre importante ricordare che gli integroni di classe 1 in quanto tali, presentano nella propria regione conservata CS3' il gene *sulI* codificante per l'enzima *dihydropteroate-synthase* che conferisce resistenza ai sulfamidici, il gene *qacEDI* responsabile della resistenza ai composti dell'ammonio quaternario e un *Open Reading Frame* (ORF5) la cui funzione è tuttavia ancora sconosciuta.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta un problema per la sanità pubblica e la sua diffusione è attribuita principalmente alla capacità dei batteri di scambiarsi orizzontalmente materiale genetico attraverso plasmidi, spesso associati agli integroni (Sunde & Norstrom, 2006).

Questo studio è nato con l'obiettivo di definire i profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza, in particolare la presenza e la caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2 in *E. coli* isolati da volatili domestici campionati in Italia tra il 2008 e il 2012. La presenza degli integroni di classe 1 e 2 è stata riscontrata sia in ceppi AFEC, sia APEC isolati da tutte le specie avicole considerate, ad esclusione dei ceppi APEC delle galline ovaiole che sono risultati tutti negativi agli integroni di classe 2. Gli integroni di classe 1 sono stati riscontrati con una frequenza maggiore negli AFEC isolati dai tacchini da carne (63,3%), mentre gli integroni di classe 2 negli AFEC



isolati dalle galline ovaiole (34,7%). Il rilievo della presenza di integroni in un numero elevato di ceppi APEC e AFEC è in accordo con quanto riscontrato in letteratura. Diversi Autori, infatti, riportano la presenza di queste strutture, in percentuali variabili a seconda dell'origine anche geografica, sia in ceppi commensali che patogeni isolati sia in allevamento che da prodotti carnei di origine avicola (Bass *et al.*, 1999; Lanz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Sunde & Norstrom, 2006; Kim *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Khaita *et al.*, 2008; Trobos *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Jouini *et al.*, 2009). Anche la minor presenza di integroni di classe 2 rispetto a quelli di classe 1 è in linea con quanto riportato in letteratura. Infatti, queste strutture si riscontrano meno frequentemente rispetto agli integroni di classe 1 e solo pochi Autori riportano di ceppi positivi ad entrambe le classi (Fluit & Schmitz, 2004).

Per quanto riguarda gli integroni di classe 1 presenti nel corredo genetico dei ceppi AFEC isolati dai tacchini da carne e dalle galline ovaiole, le cassette geniche riscontrate con frequenza maggiore sono state le combinazioni dei geni *aadA* e *dfrA* (nelle varianti alleliche *dfrA1-aadA1* e *dfrA12-aadA2*), seguite da *dfrA12-orfF-aadA2* e singolarmente i geni *dfrA7* e *sat*. Questi geni, ad eccezione di *orfF* la cui funzione non è ancora nota, codificano per enzimi responsabili della resistenza alla streptomina, spectinomina, streptotricina e al trimethoprim. Anche gli integroni di classe 2 hanno presentato cassette geniche tra le più frequentemente riscontrate in letteratura, vale a dire *sat2*, *aadA1* e *dfrA1*.

Analogamente ai ceppi AFEC, la maggior parte degli integroni di classe 1 presenti nei ceppi di APEC isolati da tacchini e broiler hanno presentato la combinazione genica *dfrA-aadA* nelle varianti *dfrA1-aadA1*, *aadA5-dfrA17* e *aadA2-dfrA12*, seguita dalla cassetta genica *aadA* (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5* e *aadA13*). Sei ceppi isolati da broiler e tacchini hanno invece presentato nella regione variabile dell'integrone il gene *sat* da solo o in combinazione con *aadA1*. Meno frequenti sono risultate le combinazioni *estX-aadA1* e *dfrA12-orfF-aadA2*. Nelle galline ovaiole, invece, era prevalente il gene *estX*. Questo riscontro è interessante, in quanto questo gene è stato spesso correlato agli integroni di classe 2, mentre solo raramente è stato associato a quelli di classe 1. Questo gene codifica per un'ipotetica esterasi o idrolasi la cui funzione non è ancora conosciuta. Tuttavia, dalla letteratura sembra esista una somiglianza con il gene *sat* responsabile della resistenza alla streptotricina (Partridge, 2005). Per quanto riguarda gli integroni di classe 2, le cassette geniche riscontrate sono state varie combinazioni dei geni *dfrA1*, *sat2* e *aadA1*. La presenza di un numero limitato di cassette geniche è in accordo con quanto riportato nella maggior parte degli articoli presenti in letteratura. Infatti, nonostante ad oggi siano state descritte in queste strutture moltissime cassette in grado di conferire resistenza a quasi tutte le classi di antimicrobici, i geni che si riscontrano più frequentemente negli integroni di classe 1 e 2 sono *dfrA* e *aadA* e *sat*, soprattutto per quanto concerne gli integroni di classe 2. Il numero e la tipologia delle cassette geniche riscontrate in queste strutture infatti è particolarmente limitata a causa di una ridotta capacità dell'integrasi di promuovere la loro inserzione nel sito di ricombinazione (Mazel, 2006).

In conclusione, questo studio fornisce un importante contributo in merito alla diffusione degli integroni in ceppi di *E. coli* isolati da avicoli domestici. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini al fine di chiarire se queste specie avicole possono fungere da *reservoir* di determinanti genetici di antibiotico-resistenza e trasmetterli all'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG and JJ Maurer. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2925-2929.
2. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC and M Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Techn. Bull. Regist. Med. Technol.* 36: 493-496.
3. Carattoli A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* 32: 243-259.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, 2<sup>nd</sup> edition. M31-A2, vol.22, no.6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved Standard, 9<sup>th</sup> edition. M2-A9, vol. 26, no. 1. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, USA.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17<sup>th</sup> informational supplement. M100-S17, vol. 26, no. 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
7. Fluit AC and FJ Schmitz. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 272-288.
8. Jouini A, Ben Slama K, Saenz Y, Klibi N, Costa D, Vinué L, Zarazaga M, Boudabous A and C Torres. (2009). Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from food of animal origin in Tunis. *J. Food Prot.* 72: 1082-1088.
9. Khaitsa ML, Oloya J, Doetkott D and R Kegode. (2008). Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from turkey meat products. *J. Food Prot.* 71: 1679-84.
10. Kim TE, Jeong YW, Cho SH, Kim SJ and HJ Kwon. (2007). Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3309-3315.
11. Lanz R, Kuhnert P and P Boerlin. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91: 73-84.
12. Lévesque C, Piché L, Larose C and PH Roy. (1995). PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 185-191.
13. Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC and L Peixe. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 296-302.
14. Mazel D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 4: 608-620.
15. Partridge SR. (2005). Correctly Identifying the Streptothricin Resistance Gene Cassette. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4298-4300.

16. Smith JL, Drum DJ, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL and MD Lee. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *App. Environ. Microbiol.* 73: 1404-1414.
17. Stokes HW and RM Hall. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-1683.
18. Sunde M and M Norström. (2006). The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 741-747.
19. Trobos M, Jacobsen L, Olsen KE, Frimondt-Moller N, Hammerum AM, Pedersen K, Agerso Y, Porsbo LJ and JE Olsen. (2008). Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections in Denmark. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32: 367-369.
20. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R and J Meng. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3483-3489.
21. White PA, McIver CJ and WD Rawlinson. (2001). Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2658-2661.
22. Zhang XY, Ding LJ and J Yue. (2009). Occurrence and characteristic of class 1 and class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers in northeastern China. *Microb. Drug Resist.* 15: 323-328.

Classe	Principio attivo	Broiler			Tacchino			Gallina ovaioia			Totale		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosidi	Apramicina 15 µg	95,5	0	4,5	95,7	1,1	3,2	96,5	1,8	1,8	96,1	0,6	3,4
	Gentamicina 10 µg	73,6	8,2	18,2	80,3	1,6	18,1	93,0	1,8	5,3	80,3	3,7	16,1
	Streptomycina 10 µg	14,5	22,7	62,7	11,2	11,7	77,1	28,1	31,6	40,4	14,9	18	67
	Kanamycina 30 µg	43,6	20	20	47,3	36,2	16,5	68,4	19,3	12,3	49,6	33,5	16,9
Cefalosporine	Cefalotina 30 µg	19,1	21,8	59,1	17,6	34	48,4	26,3	33,3	40,4	19,4	30,4	50,1
	Cefotaxime 30 µg	66,4	20	13,6	85,1	7,4	7,4	71,9	22,8	5,3	62,5	22,3	15,2
	Ceftiofur 30 µg	56,4	25,5	18,2	65,4	20,7	13,8	66,7	21,1	12,3	77,2	13,8	9
	Ceftazidime 30 µg	87,3	7,3	5,5	95,2	1,6	3,2	87,7	1,8	10,5	91,5	3,4	5,1
Penicilline	Ampicillina 10 µg	18,2	2,7	79,1	4,3	1,1	94,7	21,1	10,5	68,4	11	3,1	85,9
	Amoxicillina + Acido Clavulanico 30 µg	73,6	16,4	10	46,3	14,4	39,4	84,4	8,8	7,0	60,8	14,1	25,1
Chinoloni e Fluorochinoloni	Acido nalidixico 30 µg	20	1,8	78,2	23,9	1,6	74,5	29,8	3,5	66,7	23,7	2,0	74,4
	Enrofloxacinina 5 µg	24,5	21,8	53,6	40,4	43,6	16	52,6	10,5	36,8	37,5	31,5	31
	Ciprofloxacina 5 µg	51,8	9,1	39,1	67,6	19,7	12,8	63,2	5,3	31,6	62	14,1	23,9
	Norfloxacinina 10 µg	53,6	8,2	38,2	80,3	4,8	14,9	66,7	3,5	29,8	69,9	5,6	24,5
Sulfamidici	Sulfametossazolo +Trimethoprim 25 µg	36,4	0	63,6	29,3	1,1	69,7	50,9	3,5	45,6	34,9	1,1	53,9
	Triplo-sulfamidico 300 µg	2,7	0,9	76,4	13,3	4,3	82,4	14,0	3,5	82,5	16,6	3,1	80,3
Tetracicline	Tetraciclina 30 µg	12,7	0	87,3	3,7	1,6	94,7	8,8	0	91,2	8,7	0,8	90,4
	Doxiciclina 30 µg	14,5	10	75,5	4,3	10,1	85,6	7,0	17,5	75,4	8,7	10,7	80,6
Fenicoli	Cloramfenicolo 30 µg	44,5	4,5	50,9	66	3,2	30,9	38,6	8,8	52,6	54,9	4,8	40,3
	Florfenicolo 30 µg	92,7	7,3	0	89,9	7,4	2,7	96,5	3,5	0	91,8	6,8	1,4
Polimixine	Colistina 10 µg	85,5	9,1	5,5	92,6	6,9	0,5	86,0	8,8	5,3	90,1	7	2,8

**Tabella 1.** Percentuali di ceppi di *E. coli* risultati sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R) alle molecole antimicrobiche testate, isolati da broiler, tacchini e galline ovaiole.

**Tabella 2.** Presenza di integroni di classe 1 e 2 e cassette geniche dei ceppi di *E. coli* isolati da tacchini, broiler e galline ovaiole.

Specie	Ceppi <i>E. coli</i>	Integroni classe 1		Integroni classe 2		Integroni classe 1 e 2		Cassette geniche	
		N°	%	N°	%	N°	%	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>
<b>Tacchini</b>	158 APEC	48/188	30,4	14/188	8,9	3/188	2	<i>aadA1</i> (19/48) <i>aadA13</i> (1/48) <i>dfrA1, aadA1</i> (25/48) <i>dfrA12, aadA2</i> (2/48) <i>estX, aadA1</i> (1/48)	<i>dfrA1, aadA1</i> (5/14) <i>sat2, aadA1</i> (1/14) <i>dfrA1, sat2, aadA1</i> (8/14)
	30 AFEC	19/30	63,3	2/30	6,7	1/30	3,3	<i>dfrA7</i> (1/19) <i>sat</i> (parziale) (1/19) <i>dfrA1, aadA1</i> (11/19) <i>dfrA12, aadA2</i> (1/19) <i>dfrA12, orfF</i> (parziale) (1/19) <i>dfrA12, aadA2, orfF</i> (parziale) (3/19) <i>dfrA12, aadA2, orfF</i> (1/19)	<i>sat2, aadA1</i> (2/2)
	188 Totale	67/188	35,6	16/188	8,5	4/188	2,1		
	<b>Broiler</b>	110 APEC	43/110	39	7/100	6,4	4/110	3,6	<i>aadA1</i> (13/43) <i>aadA2</i> (1/43) <i>aadA5</i> (1/43) <i>dfrA7</i> (1/43) <i>sat</i> (2/43) <i>sat</i> (parziale) (2/43) <i>dfrA1, aadA1</i> (19/43) <i>dfrA17, aadA5</i> (1/43) <i>estX, aadA1</i> (1/43) <i>sat2, aadA1</i> (1/43) <i>dfrA12, orfF, aadA2</i> (1/43)
<b>Galline ovaiole</b>	31 APEC	11/31	35,5	0/31	0	0/31	0	<i>aadA1</i> (2/11) <i>estX</i> (8/11) <i>dfrA1, aadA1</i> (1/11)	
	26 AFEC	6/26	23	9/26	34,7	4/26	15,4	<i>aadA1</i> (3/6) <i>dfrA1, aadA1</i> (3/6)	<i>sat2, aadA1</i> (5/9) <i>dfrA1, sat2, aadA1</i> (4/9)
<b>Totale</b>	355	128	36	32	9	12	3,4		

## IMPIEGO DEL MALDI-TOF PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE BATTERICHE CLINICAMENTE RILEVANTI PER IL POLLAME

Drigo I.<sup>1\*</sup>, Pascoletti S.<sup>1</sup>, Gobbo F.<sup>2</sup>, Catania S.<sup>2</sup>, Moret C.<sup>1</sup>, Agnoletti F.<sup>1</sup>, Bano L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sez. Territoriale di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba (TV)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT3 Sez. Diagnostica di Padova, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

\*Corresponding Author. Email: [idrigo@izsvenezie.it](mailto:idrigo@izsvenezie.it), Tel: +39 0422 302 302

### Summary

Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has emerged as a new, fast and reliable tool for bacterial identification. In the present study this proteomics-based method has been applied for the identification of bacterial pathogens of relevant interest for poultry. Strains of *Escherichia coli* (n=10), *Salmonella gallinarum* (n=10), *Salmonella pullorum* (n=2), *Ornithobacterium rhinotracheale* (n=12), *Riemerella anatipestifer* (n=4), *Clostridium perfringens* (n=10), *Clostridium septicum* (n=10), *Enterococcus cecorum* (n=10), *Pasteurella multocida* (n=5), *Gallibacterium anatis* (n=10), *Mycoplasma gallisepticum* (n=10), *Mycoplasma synoviae* (n=13) and *Mycoplasma iowae* (n=9) routinely isolated from Italian poultry flocks and identified by conventional techniques (biochemical or biomolecular methods) were tested by MALDI TOF MS technology. Three different protein extraction methods were used and the achieved protein fingerprint signatures were matched with spectra included in the database provided by the instrument supplier. All strains belonging to *C. septicum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. multocida*, *R. anatipestifer* and *O. rhinotracheale* species were correctly identified with score  $\geq 2.0$ . *Salmonella* species were correctly identified only at genera level. Misidentification or not reliable identification for some *E. cecorum*, *G. anatis* and *Mycoplasma spp* were observed. Failure on obtaining a good identification for above mentioned strains are attributable to the absence of adequate reference spectra in the MALDI Biotyper database. In conclusion, MALDI-TOF is a valid tool for identification of pathogens of poultry interest even if, for some species (e.g. *Mycoplasma spp*) further extension of the instrument database and optimization of extraction protocols should to be implemented.

### INTRODUZIONE

La spettrometria di massa basata sulla tecnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) è stata recentemente introdotta nei laboratori di diagnostica microbiologica e si è dimostrata un valido e veloce strumento per l'identificazione batterica. Numerosi studi in campo umano hanno infatti dimostrato come questa tecnica possa efficacemente sostituire i test fenotipici classici per l'identificazione della maggior parte dei patogeni batterici routinariamente isolati dai campioni clinici (1-4).

Il principio su cui si basa la tecnologia MALDI-TOF è la possibilità di separare

una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Il campione opportunamente trattato viene irradiato con un laser pulsato che ne permette il desorbimento e la ionizzazione, gli ioni così prodotti vengono accelerati grazie all'esposizione ad un campo elettrico e separati in base alla loro  $m/z$  attraverso la corsa lungo un tubo di volo posto sottovuoto (5). Nel caso specifico dell'identificazione batterica, il materiale di partenza è un estratto proteico del microorganismo mescolato con un'ideale matrice che ne favorisce la ionizzazione. Il risultato della corsa è costituito da uno spettro proteico che risulta differente tra microorganismi appartenenti a diverse specie e nel quale vengono riportati i valori  $m/z$  di tutte le proteine ionizzate. Il passaggio finale che porta all'identificazione è la comparazione di questi fingerprints proteici con un database di spettri di referenza mediante l'uso di specifici algoritmi i quali generano una lista di possibili specie di appartenenza con un valore indicante l'affidabilità di ciascun abbinamento (1, 6). Numerosi studi hanno valutato e messo in luce l'utilità e l'affidabilità della spettrometria di massa in ambito umano ma i dati sono ancora mancanti per quanto riguarda l'applicazione in campo veterinario (1-4, 7, 8). Lo scopo di questo lavoro preliminare è stato quindi quello di valutarne l'applicazione per l'identificazione di specie batteriche clinicamente rilevanti per il pollame.

## MATERIALI E METODI

*Ceppi.* Sono stati inclusi nello studio un totale di 120 ceppi appartenenti alle seguenti specie: *Escherichia coli* (n=10), *Salmonella gallinarum* (n=10), *Salmonella pullorum* (n=2), *Ornithobacterium rhinotracheale* (n=12), *Riemerella anatipestifer* (n=4), *Clostridium perfringens* (n=10), *Clostridium septicum* (n=10), *Enterococcus cecorum* (n=10), *Pasteurella multocida* (n=5), *Gallibacterium anatis* (n=10), *Mycoplasma gallisepticum* (n=10), *Mycoplasma synoviae* (n=13), *Mycoplasma Iowae* (n=9) e *Mycoplasma melagridis* (n=3). Tutti i ceppi sono stati identificati mediante test biochimici convenzionali e/o mediante test biomolecolari e coltivati in opportuni terreni e adeguate condizioni di crescita.

*Preparazione del campione.* Tutti i campioni sono stati analizzati in due repliche. Per valutare l'influenza del tipo di estrazione sul numero e l'affidabilità dell'identificazione tutti i microorganismi ad eccezione dei micoplasmi, sono stati sottoposti ad analisi diretta, estrazione "in situ" con etanolo e acido formico al 70% e ad estrazione completa con etanolo, acido formico al 70% e acetonitrile. Data la difficoltà ad ottenere una quantità adeguata di pellet batterico i micoplasmi sono stati sottoposti solo ad estrazione classica a partire da una brodocoltura.

*Identificazione mediante MALDI-TOF MS.* L'identificazione è stata effettuata utilizzando lo strumento Microflex LT (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) equipaggiato con il software FlexControl (versione 3.3, Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati acquisiti automaticamente in linear positive mode con un range da 2 a 20 kDa. Per la ionizzazione del campione è stata utilizzata come matrice una soluzione satura di HCCA (Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid, Bruker Daltonics) in 50% di aceto nitrile e 2,5% di acido trifluoroacetico come da indicazioni del produttore. L'analisi automatica degli spettri grezzi è stata

eseguita con il software MALDI Biotyper RT Classification (versione 3.1, Bruker Daltonics) utilizzando una libreria di 4613 spettri di referenza. In accordo con i criteri proposti dalla ditta produttrice l'identificazione è stata considerata valida a livello di specie per scores  $x \geq 2,0$ , a livello di genere per scores  $1,7 \leq x < 2$  mentre non è stata considerata affidabile per valori di scores  $x < 1,7$ .

*Implementazione del database con ceppi di campo e referenza di Mycoplasma spp.*  
Per l'implementazione del database ciascun ceppo è stato estratto con procedura classica e i campioni sono stati analizzati in 12 repliche. Gli spettri ottenuti sono stati ispezionati e quelli considerati outlier sono stati eliminati. Gli spettri rimanenti sono stati analizzati mediante il software MALDI Biotyper 3 (versione 3.1, Bruker Daltonics) e inseriti nel database come MSPs (Main Spectra).

## RISULTATI

Degli 83 microorganismi testati con tutti e tre i metodi di estrazione 11/83 (13.25%), 4/83 (4.8%) e 2/83 (2.4%) ceppi hanno dato rispettivamente dopo analisi diretta, estrazione “in situ” e estrazione completa scores  $x < 1,7$  e quindi identificazioni non affidabili sia a livello di genere che di specie. Lo strumento ha restituito identificazioni con scores  $x \geq 2,0$  in 65/83 ceppi (78.31%) non sottoposti ad estrazione, in 74/83 (89.1%) dei campioni estratti con metodica “in situ” e in 78/83 (94%) dei ceppi con estrazione completa. Il numero di ceppi con score  $1,7 \leq x < 2$  (identificazione di genere) è risultato invece essere di 9/83 (10.8%), 5/83 (6%) e 3/83 (3,6%) rispettivamente per l'analisi diretta, l'estrusione “in situ” e l'estrusione etanolica (Tabella 1). Da questi dati è emerso quindi che l'estrusione classica seppur più laboriosa e lunga, consente l'identificazione di un maggior numero di specie con risultati migliori anche in termini di ripetibilità.

Per quanto riguarda le singole specie prese in considerazione, tutti i *C. speticum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. multocida*, *R. antipestifer* e *O. rhinotracheale* hanno dato una corretta identificazione di specie con scores  $x \geq 2$ . 9/10 *E. cecorum* sono stati correttamente identificati a livello di specie (score  $x \geq 2$ ) mentre il restante ceppo solo a livello di genere. Sono state identificate a livello di genere con score  $x \geq 2$  anche tutte le *Salmonella spp.* 2/10 *G. anatis* hanno dato un'identificazione non affidabile, 1/10 un'identificazione con score  $1,7 \leq x < 2$  mentre i restanti 7 ceppi sono stati correttamente identificati.

Per quanto riguarda i micoplasmi, identificazioni con score  $x \geq 2$  sono state ottenute solo per 6/37 (16,21%) campioni. *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. melagridis* hanno sempre restituito identificazioni inaffidabili con score intorno a 1 ma tale dato trova riscontro nel fatto che nessun microorganismo appartenente a queste specie è presente nel database dello strumento. Dei 12 *M. gallisepticum* analizzati solo 5 (41.6%) sono stati correttamente identificati, 6 (50%) sono stati erroneamente classificati come *M. ovipneumoniae* e 1 (8.3%) non ha presentato appaiamenti significativi con nessuno dei batteri presenti nel database (Tabella 1).



Specie	n°	Score			% ID corretta
		<1,7	1.7≤x<2	≥2	
<i>Enterococcus cecorum</i>	10	/	1 (10%)	9 (90%)	100%
<i>Clostridium septicum</i>	10	/	/	10 (100%)	100%
<i>Clostridium perfringens</i>	10	/	/	10 (100%)	100%
<i>Escherichia coli</i>	10	/	/	10 (100%)	100%
<i>Salmonella gallinarum</i>	10	/	/	10 (100%)	100% genere
<i>Salmonella pullorum</i>	2	/	/	2 (100%)	100% genere
<i>Pasteurella multocida</i>	5	/	/	5 (100%)	100%
<i>Riemerella anatipestifer</i>	4	/	/	4 (100%)	100%
<i>Ornitobacterium rhinotracheale</i>	12	/	/	12 (100%)	100%
<i>Gallibacterium anatis</i>	10	2 (20%)	2 (20%)	6 (60%)	80%
<i>Mycoplasma synoviae</i>	13	13 (100%)	/	/	0%
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	12	1 (8,3%)	5 (41,6%)	6 (50%)	41.6%
<i>Mycoplasma iowae</i>	9	9 (100%)	/	/	0%
<i>Mycoplasma melagris</i>	3	3 (100%)	/	/	0%

**Tabella 1.** Specie e numero di ceppi analizzati. Valori di score ottenuti e percentuale di identificazione corretta dopo confronto con gli spettri di riferimento inclusi nel database dello strumento.

Tutti i *Mycoplasma spp* indicati in tabella 1 e comprendenti sia ceppi di riferimento che di campo, sono stati quindi nuovamente analizzati e utilizzati per l'implementazione del database dello strumento e l'affidabilità e l'utilità dell'implementazione è stata valutata analizzando in doppio cieco 8 ceppi di campo due per ogni specie presa in considerazione. Utilizzando il database implementato tutti i microorganismi sono stati correttamente identificati con scores  $\geq 2.4$  (Tabella 2).

Specie	n°	Database Bruker (scores, media±dev.st)	Database implementato (scores, media±dev.st)
<i>Mycoplasma synoviae</i>	2	1,25±0,08	2,58±0,04
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	2	1,33±0,03	2,73±0,05
<i>Mycoplasma iowae</i>	2	1,47±0,26	2,59±0,03
<i>Mycoplasma melagris</i>	2	1,28±0,09	2,40±0,07

**Tabella 2.** Risultati ottenuti per 8 ceppi di campo di *Mycoplasma spp* utilizzando il database Bruker e il database implementato con i ceppi di campo.

## DISCUSSIONE

L'identificazione batterica nei laboratori di microbiologia clinica è classicamente basata sull'esecuzione di test fenotipici e/o biochimici spesso laboriosi, *time-consuming* e alcune volte difficilmente interpretabili e che quindi portano frequentemente a risultati imprecisi. Alternativamente ai metodi fenotipi, negli ultimi anni sono stati sviluppati e sempre più utilizzati anche metodi di biologia molecolare basati sulla PCR o sul sequenziamento. Queste metodiche possiedono sicuramente un maggior potere discriminante rispetto ai metodi classici d'identificazione e hanno permesso di ridurre notevolmente i tempi di risposta sono però più costose e richiedono personale con specifiche competenze. La tecnologia MALDI-TOF è stata largamente utilizzata in passato come strumento di ricerca per l'analisi di proteine e solo recentemente è stata applicata alla microbiologia clinica. Comparata con i metodi fenotipici convenzionali o con quelli biomolecolari questa tecnica risulta essere molto più rapida, caratterizzata da alto throughput e da un costo ridotto dei reagenti. Numerosi lavori pubblicati negli ultimi anni allo scopo di valutare l'efficienza e affidabilità di questa metodica in campo umano hanno evidenziato una corretta identificazione in più del 85% delle specie considerate (1-4, 7, 8). In questo studio, escludendo i microorganismi appartenenti al genere *Mycoplasma* che non sono contenuti nel database dello strumento, e considerando solo i risultati ottenuti con estrazione etanolica la percentuale di corretta identificazione a livello di specie con score  $\times 2$  è risultata superiore al 93% e quindi perfettamente in linea con i dati riportati in letteratura. Nessun problema di identificazione è stato infatti riscontrato per *C. speticum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. multocida*, *R. antipestifer* e *O. rhinotracheale*. Alcuni problemi di identificazione sono stati riscontrati invece per *E. cecorum* e *G. anatis* e tale insuccesso può essere spiegato dal numero ridotto di spettri di referenza contenuti nel database dello strumento, rispettivamente 4 per *E. cecorum* e 2 per *G. anatis*. Per quanto concerne i micoplasmi, delle 4 specie prese in considerazione 3 (*M. iowae*, *M. synoviae* e *M. melagridis*) non erano incluse nel database e per tale motivo nessuno dei microorganismi è stato identificato né a livello di specie né di genere. Nel database erano invece presenti due ceppi di riferimento di *M. gallisepticum* ma nonostante ciò una corretta identificazione è stata ottenuta solo in 6 dei 13 ceppi; dei restanti *M. gallisepticum*, 6 sono stati erroneamente identificati come *M. ovipneumoniae* (scores compresi tra 1,750 e 2.4) mentre un ceppo non ha dato alcun appaiamento significativo con nessuno dei ceppi presenti nel database. I ceppi di campo analizzati sono stati quindi utilizzati per l'implementazione del database dello strumento e una prova a doppio cieco con 8 ceppi di campo ha successivamente dimostrato che la mancanza o l'errata identificazione era ascrivibile alla mancanza di adeguati spettri di referenza.

## CONCLUSIONI

I nostri risultati dimostrano che lo strumento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) è in grado di sostituire efficacemente i convenzionali metodi di identificazione dei patogeni aviari riducendo notevolmente il costo e il tempo di risposta. Tuttavia, quanto evidenziato per i microorganismi appartenenti al genere *Mycoplasma*, sottolinea come per alcune specie sia necessaria l'implementazione del database sia con ceppi di referenza che di campo e l'ottimizzazione del protocollo di estrazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1549-54.
2. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1169-75.
3. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab.* 2009;55(7-8):289-96.
4. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009 Aug 15;49(4):543-51.
5. Lartigue MF. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:230-5.
6. Demirev PA, Fenselau C. Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2008;1:71-93.
7. Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):900-7.
8. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):693-6.

## MYELOID LEUKOSIS IN BROILER CHICKEN FARMS LEUCOSI MIELOIDE IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI DI BROILER

\*Franciosini M. P., \*Casagrande-Proietti P., \*Tacconi G., \*\*Grilli G., \*\*\*Piccirillo A.

\* *Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia*

\*\* *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano*

\*\*\* *Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova*

### ABSTRACT

Avian Leukosis-Sarcoma (ALS) Complex includes a variety of transmissible tumors of birds, caused by *Retroviridae*. Lymphoid leukosis is the most common form of the disease, but in recent years myelocytomatosis and myeloblastosis have been increasingly reported in heavy breeders, in commercial hens, and more rarely, in broiler chickens. This paper reports on neoplastic lesions, occurred spontaneously in broilers between 40-50 days on two consecutive productive cycles. The histological study revealed neoplastic cells with pleomorphism, irregularly distributed with atypical mitotic figures, containing eosinophilic granulations, typical features of the myeloid lineage. The early presence of these tumors in chickens from the same breeding supports the hypothesis of vertical transmission, typical of Retroviruses infections. Future immunohistochemical examinations should contribute definitely to the etiology of the disease.

### INTRODUZIONE

Il Complesso Leucosi-Sarcoma Aviario (ALS) comprende una varietà di tumori trasmissibili a carattere benigno e maligno dei volatili, causati da membri appartenenti alla famiglia *Retroviridae* (Fenton et al., 2005). La leucosi linfoide in questo ambito è una delle forme di più frequente riscontro, sebbene negli ultimi anni siano aumentate le segnalazioni inerenti a forme di mielocitomatosi e mieloblastosi in riproduttori pesanti (Bagust et al., 2004; Thapa et al., 2004; Venugopal, 1999), in galline commerciali (Xu et al., 2004; Cheng et al., 2005) e, sebbene più raramente in polli broiler (Fadly e Smith, 1999; Wang e Juan, 2002; Thapa et al., 2004; Fenton et al., 2005). Dei numerosi sottogruppi virali ALS, ALV- J, segnalato la prima volta in Inghilterra (Payne et al., 1991), è ritenuto il principale responsabile della comparsa di forme di leucosi mieloide e mielocitomatosi. In questa sede vengono descritti casi di leucosi mieloide, verificatisi spontaneamente in campo in 2 cicli successivi di broiler di età compresa tra i 40-50 giorni.

### MATERIALI E METODI

#### *Descrizione del caso*

I 32 soggetti, esaminati in ambedue i casi, di età compresa tra i 40-50 gg appartenevano alla linea Ross 708. La mortalità giornaliera del ciclo era di poco superiore alla norma oscillando, dopo i 30 giorni, intorno all'1,5 per 1000 e imputabile per lo più a Sindrome Ascite/Ipertensione Polmonare (SA/IP). I volatili sono stati sottoposti ad esame anatomico-patologico e quindi si è proceduto a fissare in formalina al 10% parti di fegato e di milza per l'esecuzione di esami istologici.



Fig.1 .Pollo. Notevole aumento di volume del fegato, con margini debordanti oltre la cavità addominale

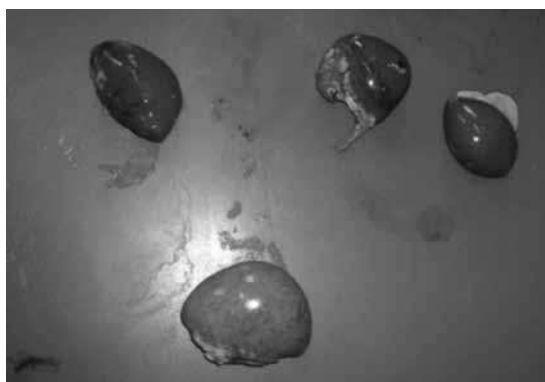


Fig.2 .Pollo. Aumento di volume della milza a confronto con altre milze di dimensioni normali (in alto).

## RISULTATI

La maggior parte dei soggetti ha presentato SA/IP con raccolte di liquido a livello della cavità addominale e del cuore ed iperemia da stasi a carico dei vari visceri. In alcuni casi si sono osservate pericardite e periepatite fibrinosa, imputabili all'azione di *E. coli*. In 8 soggetti, 3 femmine e 5 maschi, era presente un aumento uniforme del volume del fegato, che debordava dalla parete addominale (fig.1). La colorazione conferiva all'organo un aspetto marezzato per la presenza diffusa di focolai di infiltrazione biancastra. La milza mostrava le medesime alterazioni, seppure in maniera più lieve (fig.2). L'osservazione istologica ha permesso di rilevare nel fegato un'abnorme proliferazione di cellule a vari stadi di maturazione, talvolta in mitosi, con presenza di granuli a carattere eosinofilo riportabili per lo più ad elementi della serie mieloide (figs.3, 4). Gli infiltrati, di varie dimensioni, seppure localizzati in prevalenza negli spazi perivascolari (fig.3), talvolta erano diffusi al parenchima epatico, determinandone una disorganizzazione dell'architettura tessutale. In un caso la lesione infiltrativa era associata a iperplasia duttale (fig.3). Nella milza gli aggregati, sovrapponibili morfologicamente a quelli descritti in sede epatica, erano frequentemente localizzati a carico della polpa rossa.

## DISCUSSIONE

ALV-J è il sottogruppo virale del Complesso Leucosi/ Sarcoma ritenuto responsabile della Leucosi mieloide, sebbene sia stato associato a varie forme neoplastiche, come il nefroblastoma, l'emangioma e il sarcoma istiocitario (Payne *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1992a; Arshad *et al.*, 1997). Tale virus viene inoltre collegato a forme di immunodepressione e scarso incremento ponderale (Stedman and Brown, 1999). Le caratteristiche della forma neoplastica sono comunque influenzate dall'età, dalla presenza di stress ambientali, dalla genetica dell'ospite, dalla concomitante presenza di agenti immunodepressivi e da trattamenti vaccinali (Venugopal, 1999; Fenton *et al.*, 2005). In precedenza le perdite economiche causate da ALV-J nel pollo da carne non sono state considerate, dati i tempi precoci di macellazione del broiler, che non consentono il manifestarsi di forme neoplastiche evidenti, che richiedono un tempo minimo di almeno 7 settimane (Payne *et al.*, 1992a). A partire dal 1999 la presenza di lesioni neoplastiche riportabili a Leucosi mieloide nel pollo da carne in età precoce si è fatta più frequente (Fadly e Smith, 1999; Wang e Juan, 2002; Thapa *et al.*, 2004; Fenton *et al.*, 2005). Nel nostro caso le cellule mieloidi descritte nelle lesioni neoplastiche, simili a quelle descritte da altri Autori (Payne *et al.*, 1992a; Mansan *et al.*, 2006) sono indicative di presenza di una leucosi a carattere mieloide, che come è noto in campo avicolo è inquadrata nell'ambito delle Retrovirus Aviarie. Va inoltre ricordato che la presenza di mielociti immaturi ricchi di granuli eosinofili riportata da Fadly e Smith (1999) viene considerata una caratteristica peculiare di forme di Leucosi mieloide. Le alterazioni sia a livello macroscopico che istologico sono state osservate in 2 cicli successivi della medesima linea (Ross 708) e alla stessa età. Il fatto che i soggetti colpiti provenivano dagli stessi riproduttori avvalorava l'ipotesi di una possibile trasmissione verticale del retrovirus, che, nel caso di ceppi particolarmente virulenti, è in grado di produrre lesioni in tempi brevi; infatti, solo alcuni isolati di ALV-J possono causare forme neoplastiche in poche settimane in seguito ad infezione embrionale o alla schiusa per trasduzione di oncogeni virali (Venugopal, 1999); in particolare i ceppi HPRS-103, largamente diffuso, e ADOL-Hc1, la cui presenza invece sembra limitata agli Stati Uniti (Fadly e Smith, 1999). Nel nostro caso non è stato possibile eseguire indagini nei gruppi di riproduttori perché trovandosi a fine carriera i soggetti erano già stati macellati. Il tentativo, effettuato in un caso, di evidenziare il genoma tramite RT-PCR utilizzata a partire dalle parti fissate in formalina ha dato esito negativo. Questo risultato non sorprende in quanto è noto che i fissativi cross-linkanti (come le aldeidi) danneggiano la qualità del RNA e la quantità estratta resta al di sotto dei limiti di sensibilità del test (Ferrari *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONI

I reperti macroscopici associati a quelli istologici sono indicativi di una forma neoplastica riportabile a Leucosi Mieloide, per le caratteristiche dell'infiltrato, costituito in prevalenza da elementi della serie mieloide. Il principale elemento cellulare risulta essere il mielocita a vari stadi di maturazione analogamente a quanto descritto da Manzan *et al.* (2006) e in precedenza da Payne *et al.* (1992). La comparsa in 2 cicli successivi della patologia in soggetti provenienti dallo stesso gruppo di riproduttori fa deporre per una probabile trasmissione verticale del Retrovirus. L'assenza di tale lesione nei soggetti da carne di origine diversa, che hanno ripopolato l'allevamento successivamente, sembra ulteriormente avvalorare l'ipotesi di una trasmissione verticale del virus.

Si rende necessario, inoltre, uno studio a carattere immunohistochimico a partire dal materiale a disposizione che possa permettere oltre all'identificazione del virus la sua localizzazione a livello di milza e fegato.

Ringraziamenti. Si ringraziano per l'assistenza tecnica la Dott. ssa Paola Coliolo e la Sig.ra. Gabriella Mancini, il Prof. Giampaolo Asdrubali per il contributo scientifico ed inoltre la Dott.ssa Paola Massi e il Dott. Giovanni Tosi per la preziosa collaborazione tecnico scientifica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arshad SS., Bland AP., Hacker SM, LM Payne L.M. (1997). A low incidence of histiocytic sarcomatosis associated with infection of chickens with the HPRS-103 strain of subgroup J avian leukosis virus. *Av. Diseases*, 41: 947-956.
2. Bagust, TJ., Fenton, SP. e MR Reddy (2004). Detection of subgroup J avian leukosis virus infection in Australian meat-type chickens. *Aust. Vet. J.*, 82: 701-706.
3. Cheng ZQ, Zhang L, Liu SD, Zhang LJ, ZZ Cui (2005). Emerging of avian leukosis virus subgroup J in a flock of Chinese local breed *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 45:584-587.
4. Fadly, AM e EJ Smith (1999). Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukosis in meat-type chickens in the United States. *Av. Diseases*, 43:391-400.
5. Fenton SP, Reddy MR. e TJ Bagust (2005). Single and concurrent avian leukosis virus infections with avian leukosis virus-J and avian leukosis virus-A in Australian meat-type chickens, *Av. Pathology*, 34:48-54.
6. Ferrari R, Frisk AL, Barbaria EM, Terron A e A Mahnke (2004). Sviluppo di una metodica per lo studio dell'espressione genica in tessuti inclusi in paraffina mediante l'uso del laser capture microdissection Atti AIP Vet. Palazzo Feltrinelli, Gargnano (BS) 30 Aprile-1 Maggio 2004.
7. Manzan RM, Baccaro MR, Ferreira A.P, Sinhorini IL e AM Moreno (2006). Histopathological and ultrastructural characteristics of myeloid leukosis in broiler chicken. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58: p757-761.
8. Payne LN, Brown SR., Bumstead N, Howes K, Frazier JA e ME Thouless (1991). A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens *J. Gen. Virol.*, 72 : 801-807.
9. Payne LN., Howes K., Gillespie AM. e LM Smith (1992a). Host range of Rous sarcoma virus pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated *J. J.Gen. Virol.*, 73: 2995-2997.
10. Stedman NL. e TP Brown (1999). Body weight suppression in broilers naturally infected with avian leukosis virus subgroup J. *Av. Diseases*, 43, 604/610.
11. Thapa BR. Omar AR, Arshad SS e M Hair-bejo M. (2004). Detection of avian leukosis virus subgroup J in chicken flocks from Malaysia and their molecular characterization. *Avian Pathol.*, 33:359-363

12. Venugopal K.(1999). Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. *Res. Vet. Sci.*, 67: 113-119.
13. Wang C.H. e Juan Y.W. (2002). Occurrence of subgroup J avian leukosis virus in Taiwan. *Avian Pathol.*, 31:435-439.
14. Xu B, Dong W, Yu C, He Z, Lv Y, Sun Y, Feng X, Li N, Lee LFe M Li (2004). Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China. *Avian Pathol.*, 33:13-7.

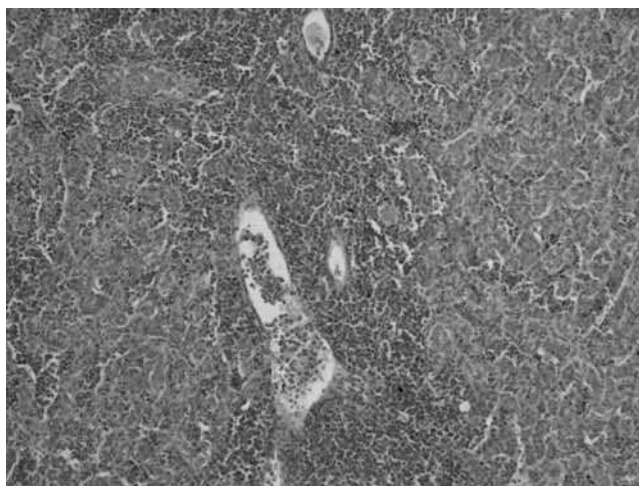


Fig. 3 Pollo. Fegato. Infiltrati di cellule della linea mieloide in sede perivascolare. Colorazione EE . Ingrandimento originale (100X)

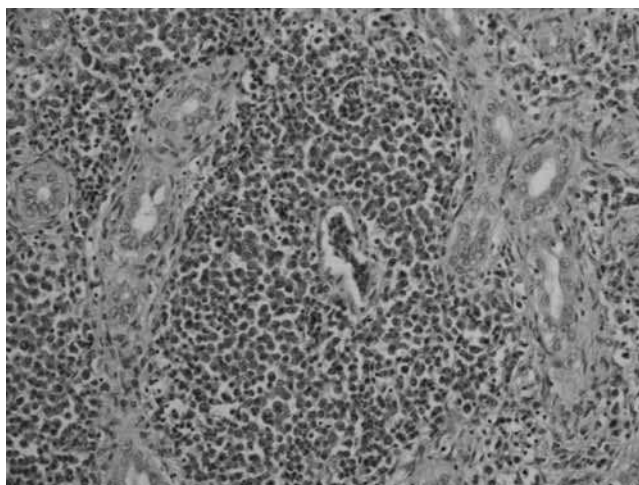


Fig. 4 Pollo. Fegato. Gli infiltrati sono risultati costituiti da elementi appartenenti alla serie mielocitica p Presenza di iperplasia duttale. Colorazione EE. Ingrandimento originale ( 200X )



## INDAGINE SULLA COLONIZZAZIONE DA *CAMPYLOBACTER* TERMOFILINI IN ALLEVAMENTI DI TACCHINI DA CARNE: RISULTATI PRELIMINARI

Giacomelli M., Maschio M., Piccirillo A.

*Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (Padova).*

### Summary

Since epidemiology of thermophilic campylobacters in turkeys has been scarcely investigated, we carried out longitudinal studies aimed at identifying potential sources and vehicles of *Campylobacter* infection in commercial meat turkey farms. A preliminary sampling in turkey breeders flocks was carried out in order to detect a *Campylobacter*-positive flock. Then, a monitoring of 2 meat turkey farms rearing the progeny of the positive turkey breeders flocks was performed. *Meconium* was collected from day-old chicks at the hatchery and then faecal swabs were collected three times at the farm (at the beginning, middle and end of the production cycle). Farm sampling consisted of multiple drinking water samples, surface swabs, air, overshoe samples in the anteroom and inside the house, and insects. Sampling was also carried out during downtime. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. were performed by a conventional culture method and a multiplex end-point PCR assay, respectively. Day-old chicks tested negative for thermophilic campylobacters, whereas *C. jejuni* and *C. coli* were subsequently isolated from birds throughout the entire cycle in all flocks except for one. Both *Campylobacter* species were also frequently isolated from drinkers, flies and lesser mealworms. Water, air from inside the house, and surface swabs were always negative. These findings suggest that vertical transmission could not be an important source of flock infection, whereas horizontal transmission should be considered the major route for colonization of turkeys, as campylobacters were found in several environmental sources.

### INTRODUZIONE

L'infezione umana da *Campylobacter* termofili (soprattutto *C. jejuni* e *C. coli*) costituisce un problema di Sanità Pubblica di notevole rilevanza, essendo ormai da anni la zoonosi più frequentemente riportata nell'Unione Europea (EFSA & ECDC, 2012) e una delle principali cause di gastroenterite batterica umana a livello mondiale (Humphrey *et al.*, 2007). Le specie avicole domestiche sono il principale *reservoir* di *Campylobacter* termofili, che albergano nel loro tratto gastroenterico senza manifestare sintomatologia. La maggior parte degli studi svolti fino ad oggi sull'infezione da *Campylobacter* spp. negli avicoli riguarda il pollo, al quale viene riconosciuto un ruolo di rilievo quale fonte d'infezione per l'uomo. Infatti, la manipolazione, la preparazione e il consumo di carne di pollo rappresentano la causa principale di campilobatteriosi umana (EFSA, 2010). Al contrario, sebbene il tacchino da carne sia considerato una potenziale fonte di trasmissione di *Campylobacter* spp. all'uomo e nonostante la sua carne sia di largo consumo, la colonizzazione da parte di *Campylobacter* spp. di questa specie avicola commerciale è stata scarsamente indagata. Da indagini svolte negli scorsi anni in Nord Italia dal

nostro gruppo di ricerca è emersa una notevole diffusione di *C. jejuni* e *C. coli* sia in allevamenti intensivi di polli, sia in allevamenti intensivi di tacchini da carne, e la persistenza di questi microrganismi durante tutto il ciclo produttivo nei gruppi di tacchini (Giacomelli *et al.*, 2012a, 2012b). Alla luce di questi riscontri, abbiamo ritenuto necessario approfondire le dinamiche epidemiologiche dell'infezione da *Campylobacter* termofili nel tacchino da carne, in particolare per individuare le possibili fonti d'introduzione e le vie di diffusione del microrganismo negli allevamenti intensivi, aspetto che non è stato ancora chiarito. A questo scopo è stato intrapreso un monitoraggio longitudinale in due allevamenti intensivi di tacchini da carne che ospitavano la progenie di riproduttori colonizzati da *Campylobacter* termofili. Il monitoraggio si è svolto per due cicli produttivi consecutivi, durante i quali sono stati presi in esame sia gli animali, sia campioni ambientali e possibili vettori di *Campylobacter* spp.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

Nella prima fase dell'indagine sono stati svolti campionamenti (60 tamponi cloacali) in gruppi di tacchini riproduttori al fine di identificare un gruppo colonizzato da *Campylobacter* spp. Successivamente, sono stati eseguiti campionamenti in due allevamenti intensivi di tacchini da carne (A e B) che hanno accasato la progenie dei riproduttori positivi. I gruppi di pulcini sono stati esaminati prima dell'accasamento, prelevando il meconio da 36 soggetti in incubatoio. Nei due allevamenti sono stati prelevati i seguenti campioni: feci ciecali (36), acqua da 3 punti della linea (inizio e fine impianto, abbeveratoi), campioni ambientali (calzari nell'anticamera e nel capannone, polvere e aria), insetti (mosche, scarafaggi e tenebrioni). Quando presenti, sono stati prelevati anche topi. I campioni sono stati raccolti durante il vuoto sanitario e durante il ciclo (inizio, metà e fine). Gli stessi campionamenti sono stati svolti anche nel ciclo successivo.

Subito dopo la raccolta, i tamponi (fecali e da abbeveratoi) sono stati posti in terreno di trasporto Amies con carbone (Copan, Brescia, Italia) e, assieme agli altri campioni, sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione fino all'arrivo al laboratorio e processati entro 1-2 ore dal prelievo. L'aria è stata aspirata tramite lo strumento SAS Super 100TM (International PBI S.r.l., Milano, Italia) direttamente su piastre di Karmali agar (OXOID, Basingstoke, UK), che sono state immediatamente inserite in apposite buste con generatori di microaerofilia CampyGen® (OXOID).

### *Isolamento e identificazione*

Le piastre di Karmali agar utilizzate per il campionamento dell'aria sono state poste in incubazione a 41,5°C per 48 ore, per poi essere esaminate alla ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. I campioni di meconio, i tamponi e i campioni ambientali sono stati inizialmente inoculati nel brodo di arricchimento selettivo Exeter rispettando un rapporto 1:10 (campione:brodo) e incubati a 41,5°C in condizioni di microaerofilia. Gli insetti sono stati riuniti in *pool* (suddivisi per specie), triturati con un pestello e quindi inoculati nel brodo Exeter come sopra descritto. Per i campioni di acqua, la fase di arricchimento selettivo è stata preceduta dalla filtrazione dell'acqua attraverso membrane sterili con pori del diametro di 0,20 µm (Sartorius, Goettingen, Germania) tramite un sistema di pompa a vuoto. Dopo 48 ore di incubazione,

un'aliquota (150 µl) di ciascuna brodocoltura è stata seminata su Karmali agar, previa filtrazione secondo la procedura descritta da Steele & McDermott (1984). Le piastre sono state incubate per 48 ore a 41,5°C in microaerofilia e quindi esaminate per la ricerca delle colonie tipiche di *Campylobacter* spp. Da ciascuna piastra sono state prelevate almeno tre colonie sospette, da sottoporre ad identificazione di genere e di specie. Questa è stata ottenuta mediante *end-point multiplex* PCR, secondo il protocollo descritto da Yamazaki-Matsune *et al.* (2007), al quale sono state apportate lievi modifiche. Il DNA è stato estratto mediante bollitura per 20 minuti di un'ansata di patina batterica stemperata in 500 µl di acqua distillata sterile.

## RISULTATI

*Campylobacter* spp. è stato isolato da tutti i riproduttori esaminati e l'identificazione di specie ha rivelato la presenza di *C. jejuni* e *C. coli*, con la predominanza della prima specie (67,7% degli isolati). Al contrario, il microrganismo non è stato isolato da nessuno dei campioni di meconio in nessuno degli allevamenti. *C. jejuni* e *C. coli* sono stati anche isolati dalle feci di tutti i gruppi di animali monitorati sia nel primo ciclo produttivo, sia nel secondo, in entrambi gli allevamenti presi in esame. A differenza di quanto riscontrato nei riproduttori, in tutti i gruppi di tacchini dell'allevamento B e in entrambi i cicli produttivi *C. coli* era la specie predominante (dal 50% al 100% dei ceppi isolati, a seconda del campionamento). La predominanza di *C. coli* su *C. jejuni* è stata riscontrata anche nell'allevamento B, in particolare nei gruppi monitorati durante il primo ciclo produttivo (dall'80% al 100% dei ceppi isolati, a seconda del campionamento), mentre nel gruppo esaminato durante il secondo ciclo *C. coli* era l'unica specie presente.

Nell'allevamento A il microrganismo è stato isolato dagli animali a partire dal campionamento di inizio ciclo e la sua presenza è stata confermata nei campionamenti successivi (metà e fine ciclo) in tutti i gruppi e in entrambi i cicli produttivi monitorati. Anche nell'allevamento B *Campylobacter* spp. colonizzava gli animali fin dall'inizio di entrambi i cicli produttivi, tuttavia, la sua presenza è stata riscontrata sino a fine ciclo solo durante il secondo ciclo produttivo e solo in un gruppo dei due presenti in allevamento nel primo ciclo.

Per quanto riguarda la ricerca di *Campylobacter* spp. in insetti, acqua e campioni ambientali, *C. jejuni* e *C. coli* sono stati isolati molto frequentemente durante i cicli produttivi da mosche e tenebrioni, insetti che erano presenti e quindi sono stati prelevati nella gran parte dei campionamenti, mentre gli scarafaggi sono stati catturati solo in un'occasione, nella quale sono risultati negativi per *Campylobacter* spp. Anche dall'acqua presente negli abbeveratoi durante il ciclo produttivo sono stati isolati frequentemente *C. jejuni* e *C. coli*. Al contrario, l'acqua di abbeverata prelevata all'inizio dell'impianto è sempre risultata negativa, mentre quella prelevata alla fine è risultata positiva solo in un caso. Similmente, solo in un caso *C. jejuni* è stato isolato dai calzari indossati nell'anticamera. Inoltre *C. jejuni* è stato isolato anche da un topo catturato nell'allevamento A a metà del secondo ciclo produttivo.

Esito sempre negativo è stato ottenuto invece dal campionamento dell'aria e dai campioni di polvere. L'isolamento di *C. jejuni* e *C. coli* dalle fonti sopra menzionate è avvenuto solo durante i cicli produttivi, mentre durante il vuoto sanitario il microrganismo non è mai stato isolato da nessuno dei campioni raccolti.

## DISCUSSIONE

Il mancato isolamento di *Campylobacter* termofili dal meconio della progenie dei riproduttori positivi suggerisce che l'infezione non venga trasmessa per via verticale nelle specie avicole, in accordo con quanto affermato da altri Autori (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2004; Callicott *et al.*, 2006). Più in generale, il riscontro di negatività in tutti i gruppi di pulcini accasati in entrambi i cicli produttivi suggerisce che il microrganismo non faccia il suo ingresso in allevamento attraverso i tacchini e conferma quanto da noi rilevato in un'indagine precedente (Giacomelli *et al.*, 2012b) e quanto riportato in altri studi sul tacchino (Hafez *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Wesley & Muraoka, 2011). Di conseguenza, appare verosimile che gli animali siano stati colonizzati da *Campylobacter* spp. successivamente al loro ingresso in allevamento, per via orizzontale. Tra le potenziali fonti e/o veicoli di trasmissione considerate nella presente indagine, l'acqua degli abbeveratoi è risultata spesso positiva durante i cicli produttivi, in concomitanza con la positività degli animali, mentre l'acqua prelevata dalla linea di abbeverata è risultata positiva solo in un caso. Sulla base di questi riscontri, l'acqua di abbeverata non sembra essere una fonte di ingresso di *Campylobacter* spp. nei gruppi di tacchini ed è quindi probabile che la contaminazione dell'acqua degli abbeveratoi sia avvenuta successivamente alla colonizzazione degli animali da parte del microrganismo. L'acqua, quindi, per quanto non sembri costituire un rischio, se non molto limitato, per l'introduzione di *Campylobacter* spp. in allevamento, può rappresentare un veicolo di diffusione di *Campylobacter* spp. nei gruppi di tacchini. Per quanto riguarda gli insetti, il loro ruolo quali possibili vettori di *Campylobacter* spp. è stato proposto e successivamente messo in luce da alcuni Autori (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995; Gregory *et al.*, 1997; Hald *et al.*, 2004), tuttavia le opinioni e i riscontri a riguardo rimangono contrastanti (EFSA, 2011). In particolare, le mosche sarebbero implicate nella trasmissione di *Campylobacter* spp. in quanto vettori meccanici di materiale fecale, e di conseguenza dei microrganismi in esso presenti, mentre scarafaggi e tenebrioni, permanendo a lungo nell'ambiente di allevamento, soprattutto nelle pareti dei capannoni, potrebbero rivestire un ruolo nella trasmissione di *Campylobacter* spp. tra cicli produttivi successivi (EFSA, 2011). Nel presente studio mosche e tenebrioni sono risultati spesso positivi per *C. jejuni* e/o *C. coli* in presenza di colonizzazione degli animali, ma mai durante il vuoto sanitario. Non potendo determinare se sia avvenuta prima la contaminazione degli insetti o la colonizzazione degli animali, si può comunque affermare che mosche e tenebrioni possono fungere da veicolo di trasmissione e quindi di diffusione di *Campylobacter* all'interno del capannone, e, nel caso delle mosche, anche all'esterno. Al contrario, la loro costante negatività durante il vuoto sanitario tende ad escludere la possibilità che questi insetti possano concorrere alla trasmissione di *Campylobacter* spp. tra cicli produttivi successivi. Infine, la negatività di tutti i campioni prelevati durante il vuoto sanitario fa pensare che *Campylobacter* spp. non persista all'interno del capannone tra cicli produttivi, ma venga reintrodotta di ciclo in ciclo. Questo aspetto andrebbe ulteriormente indagato attraverso studi mirati. Per quanto riguarda invece la persistenza di *Campylobacter* spp. nei tacchini durante uno stesso ciclo produttivo, merita attenzione il fatto che un gruppo sia risultato negativo al campionamento svolto poco prima del carico per la macellazione, e che in un altro gruppo sia stata osservata una riduzione del numero di campioni fecali positivi in occasione dell'ultimo campionamento

rispetto ai precedenti. Per quanto numericamente limitate, queste osservazioni sono degne di nota. Infatti, benché si ritenga che, così come nel broiler, l'infezione da *Campylobacter* spp. nel tacchino non sia autolimitante (Hafez *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004; Wesley & Muraoka, 2011), nonostante il ciclo produttivo di quest'ultima specie sia notevolmente più lungo, è stata segnalata una riduzione della frequenza di isolamento di *Campylobacter* spp. con il progredire del ciclo produttivo in gruppi di tacchini da carne (Kiess *et al.*, 2007; Thorsness *et al.*, 2008).

## CONCLUSIONI

I risultati preliminari dell'indagine da noi svolta allo scopo di approfondire le dinamiche epidemiologiche dell'infezione da *Campylobacter* termofili nell'allevamento del tacchino da carne hanno innanzitutto confermato la diffusa e persistente presenza di *C. jejuni* e *C. coli* in questa specie animale destinata al consumo umano. Inoltre, sembrano avvalorare l'ipotesi circa il limitato ruolo della trasmissione verticale nell'introduzione di *Campylobacter* spp. nei gruppi di tacchini, ed individuato dei possibili veicoli e/o fonti di trasmissione di questi microrganismi nell'ambiente di allevamento. Sulla base dei riscontri finora ottenuti, l'indagine proseguirà con la caratterizzazione genetica dei ceppi isolati dalle diverse matrici analizzate, in modo tale da approfondire le eventuali relazioni tra i ceppi di diversa origine ed accertare quali possano essere le fonti o i veicoli d'infezione più accreditati. Questo aspetto è particolarmente importante, perché solo conoscendo quali sono le fonti d'infezione e i veicoli di trasmissione di *Campylobacter* spp. in allevamento è possibile elaborare delle strategie di prevenzione e controllo in grado di limitare la contaminazione dei gruppi di animali e il ciclo infettivo del microrganismo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Callicott KA, Friethriksdóttir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Gunnarsson E, Berndtson E, Hiett KL, Needleman DS and NJ Stern. (2006). Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5794-5798.
2. European Food Safety Authority. (2010). Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal*, 8: 1437.
3. European Food Safety Authority. (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *The EFSA Journal* 9: 2105.
4. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10: 2597.
5. Giacomelli M, Andrighetto C, Rossi F, Lombardi A, Rizzotti L, Martini M and A Piccirillo. (2012a). Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in northern Italy. *Avian Pathol.* 41: 579-588.

6. Giacomelli M, Andrighetto C, Lombardi A, Martini M and A Piccirillo. (2012b). A longitudinal study on thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial turkey flocks in northern Italy: occurrence and genetic diversity. *Avian Dis.* 56: 693-700.
7. Gregory E, Barnhart H, Dreesen DW, Stern NJ and JL Corn. (1997). Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence. *Avian Dis.* 41: 890-898.
8. Hafez HM, Schroth S, Stadler A and D Schulze. (2001). Detection of *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxin producing *E. coli* in turkey flocks during rearing and processing. *Arch. Geflueglk.* 65: 130-135.
9. Hald B, Skovgard H, Bang DD, Pedersen K, Dybdahl J, Jespersen JB and M Madsen. (2004). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1490-1492.
10. Humphrey T, O'Brien S and M Madsen. (2007). Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 237-257.
11. Jacobs-Reitsma WF, van de Giessen AW, Bolder NM and RW Mulder. (1995). Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol. Infect.* 114: 413-421.
12. Kiess AS, Kenney PB and RR Nayak. (2007). *Campylobacter* detection in commercial turkeys. *Br. Poult. Sci.*, 48: 567-572.
13. Smith K, Reimers N, Barnes HJ, Lee BC, Siletzky R and S Kathariou. (2004). *Campylobacter* colonization of sibling turkey flocks reared under different management conditions. *J. Food Prot.* 67: 1463-1468.
14. Steele TW and SN McDermott. (1984). The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology* 16: 263-265.
15. Thorsness JL, Sherwood JS, Danzeisen GT, Doetkott C and CM Logue. (2008). Baseline *Campylobacter* prevalence at a new turkey production facility in North Dakota. *J. Food Prot.* 71: 2295-2300.
16. Wesley IV and WT Muraoka. (2011). Time of entry of *Salmonella* and *Campylobacter* into the turkey brooder house. *Food Bioprocess. Technol.* 4: 616-623.
17. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, Kitazato M, Nukina M, Misawa N and T Tsukamoto. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.* 56: 1467-1473.

## NUOVE SPECIE DI MALLOFAGI (*INSECTA: PHTHIRAPTERA*) PER L'AVIFAUNA ITALIANA.

Giacomelli S.<sup>1</sup>, Gallazzi D.<sup>1</sup>, Grilli G.<sup>1</sup>, Pozzi M.<sup>1</sup>, Scebba S.<sup>2</sup>, Soprano M.<sup>2</sup>, Vas Z.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica - Facoltà di Medicina Veterinaria Via Celoria 10 - 20133 Milano

<sup>2</sup> Gruppo Inanellamento Limicoli (G.I.L., Napoli) Via Traversa 58 - 80078 Pozzuoli - Napoli

<sup>3</sup> Hungarian Natural History Museum, Dept. of Zoology, H-1088 Budapest, Baross str. 13, Hungary.

### ABSTRACT

Gli *Phthiraptera* (comunemente chiamati pidocchi) sono insetti privi di ali, ectoparassiti obbligati che completano tutto il loro ciclo vitale sul corpo di un organismo ospite dove si nutrono principalmente di frammenti di penne, epidermide desquamata, sangue o secreti (Johnson & Clayton 2003).

L'infestazione avviene in maniera opportunistica soprattutto quando gli ospiti sono in stretto contatto, come ad esempio durante l'accoppiamento.

Anche per questa ragione essi dimostrano un grado di ospite-specificità di gran lunga superiore alla maggior parte di altri parassiti metazoi (Marshall, 1981).

Attualmente, in Italia, è stata riscontrata e segnalata la presenza di 267 specie di *Phthiraptera* (Manilla 2003), associate soprattutto ad uccelli ed in particolar modo a passeriformi.

In questo articolo si desidera rendere note sei specie di mallofagi, non ancora segnalate in Italia, rilevate su uccelli consegnati a un centro di recupero animali selvatici (C.R.A.S.) o catturati tramite reti in centri di inanellamento autorizzati dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) nel periodo dal 2006 al 2012.

Gli ectozoi sono stati raccolti grazie alla nebulizzazione di spray antiparassitario a base di piretroidi, attraverso una tecnica standardizzata.

Il campione risulta quindi composto da 362 uccelli, di cui 38 positivi ad ectoparassiti della classe *Insecta* per un totale di 189 ectozoi raccolti appartenenti all'ordine *Phthiraptera* (62 *Amblycera*, 127 *Ischnoera*).

Oltre ad altri parassiti già precedentemente segnalati nella checklist della fauna italiana (Manilla 2003) sono stati da noi raccolti:

- *Bruelia jacobii* (1 ninfa) da merlo (*Turdus merula*);
- *Coloceras piageti* (9 femmine, 8 maschi, 2 ninfe) da tortora dal collare orientale (*Streptopelia decaocto*);
- *Columbicola bacillus* (20 femmine, 23 maschi, 8 ninfe) da tortora dal collare orientale (*Streptopelia decaocto*);
- *Hohorstiella modesta* (1 ninfa) da tortora dal collare orientale (*Streptopelia decaocto*);
- *Menacanthus sinuatus* (3 ninfe) da cinciallegra (*Parus major*);
- *Ricinus serratus* (3 femmine) da allodola (*Alauda arvensis*).

È stata inoltre riscontrata la presenza di una larva appartenente al genere *Menacanthus* su di un esemplare di pettirosso (*Erithacus rubecula*), associazione non ancora nota a livello mondiale (Price *et al.* 2003). Quest'ultima segnalazione necessita però di ulteriori approfondimenti poiché, al momento, non è possibile escludere una cross-infestazione accidentale (ad esempio attraverso i contenitori utilizzati per il trasporto dalle reti di cattura al centro di inanellamento).

La presente pubblicazione vuole dare un piccolo contributo allo studio degli *Phthiraptera* in Italia, ampliando le conoscenze acquisite da importanti studi precedenti (Simonetta 1882; Picaglia 1885 a-b; Berlese 1894-1895; Conci 1940 a-b-c; Manilla & Cicolani 1983; Martin-Mateo & Manilla 1988) riguardo a un ordine di ectoparassiti che può di certo essere sfruttato per la sua peculiare valenza ecologica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Berlese A. (1894). Materiali per un catalogo dei Mallofagi e Pediculini italiani. I. Bull. Soc. Ent. It. 26: 51-65.
2. Berlese A. (1895). Materiali per un catalogo dei Mallofagi e Pediculini italiani. II. Bull. Soc. Ent. It. 27: 232-244.
3. Conci C. (1940) a. Note sui Mallofagi italiani. I. Boll. Soc. Ent. It. 72: 71-81.
4. Conci C. (1940) b. Note sui Mallofagi italiani. II. Una nuova varietà di *Stachiella retusa* Nitzsch. Boll. Soc. Ent. It., 72: 116-118.
5. Conci C. (1940) c. Note sui Mallofagi italiani. III. Mallofagi del Museo di Storia Naturale della Venezia Tridentina. Studi Trentini Sc. Nat., 21: 191-193.
6. Johnson KP, Clayton DH. (2003). The biology, ecology, and evolution of chewing lice. Pp. 449-476. In: Price, R. D., Hellenthal, R. A., Palma, R. L., Johnson, K. P., Clayton, D. H. (eds). The chewing lice, world checklist and biological overview. - Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
7. Manilla G. (2003) checklist of the Italian fauna on-line version, Checklist: Copyright © 2000 by the Italian Ministry of Environment, Website: Copyright © 2003 by Fabio Stoch. All Rights Reserved. Fascicolo 39, Phthiraptera.
8. Manilla G, Cicolani B. (1983). Mallofagi rinvenuti su uccelli in Abruzzo. Riv. Parassitol., 44: 217-232.
9. Martin-Mateo M, Manilla G. (1988). Nuevos Malofagos de Aves en Italia. Riv. Parassitol., 49: 141-150.
10. Marshall AG. (1981). The Ecology of Ectoparasitic Insects. Academic Press, London, UK.
11. Picaglia L. (1885) a. Pediculini nuovi del Museo di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Modena. Atti Soc. It. Sc. Nat., 28: 82-90.
12. Picaglia L. (1885) b. Pediculini dell'Istituto Anatomico Zoologico della R. Università di Modena. Atti Soc. Naturalisti Modena, 4: 97-162.
13. Price, R. D., Hellenthal, R. A., Palma, R. L. 2003. World checklist of chewing lice with host associations and keys to families and genera. Pp. 1-448. In: Price, R. D., Hellenthal, R. A., Palma, R. L., Johnson, K. P., Clayton, D. H. (eds). The chewing lice, world checklist and biological overview. - Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
14. Simonetta L. (1882). Elenco sistematico dei Pediculini appartenenti al Museo Zoologico della R. Università di Pavia. Boll. Soc. Ent. It., 14: 204-220.



## **EFFETTI DELLA VACCINAZIONE CON BIO-VAC SGP695 IN GALLINE OVAIOLE INFETTATE SPERIMENTALMENTE CON *S. ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS**

Lozito P. <sup>1</sup>, Fontana M.C. <sup>2</sup>, Merialdi G. <sup>2</sup>, Meliota F. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> FATRO S.P.A.

<sup>2</sup> ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA "B. UBERTINI" - SEZ. DI BOLOGNA

### **SUMMARY**

BIO-VAC SGP695 is a freeze-dried vaccine having as active substance the live attenuated strain *Salmonella gallinarum/pullorum* SGP695AV<sup>c</sup> (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum, otherwise *S. Gallinarum*) able to confer protection against fowl typhoid.

*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) is one of the most important problems for the poultry rearing and especially laying hens due to public health implications related to the unique ability of this serotype to infect the ovary and consequently contaminate the eggs.

Since both *S. Gallinarum* and *S. Enteritidis* belong to serogroup O D1, respectively with antigenic formula 1,9,12:-:- and 1,9,12:g,m:-, does exist a good degree of cross-protection between the two serovars.

*S. Enteritidis* can infect domestic fowl, with particular tropism for the adult ovary and can be present as a contaminant in eggs laid, resulting in significant risk to public health.

The study was conducted to evaluate the efficacy of the vaccine BIO-VAC SGP695 in adult layer hens challenged with a wild strain of *S. Enteritidis*.

Fifty-seven 50 weeks-old layer hens, in lay, obtained from a commercial Hy-line flock, were divided into 2 groups. The first group of 28 subjects, was vaccinated orally with a minimum dose of BIO-VAC SGP695 while the second group of 29 subjects, was used as an untreated control.

Approximately three weeks after vaccination, all the birds were subjected to oral challenge with  $1,3 \times 10^9$  CFU/bird of a wild strain of *S. Enteritidis* (PT 4).

At predetermined intervals after challenge (4, 7 and 11 days), an equal number of birds was taken from the two groups and sacrificed to perform the post-mortem examination, directed at the identification of specific lesions caused by infection to the liver, spleen and ovary and the bacteriological reisolation of the challenge microorganism from the above-mentioned organs.

Following challenge, just one subject, of the control group, showed symptoms; no mortality was recorded. At the post-mortem examination, lesions to the organs examined were found only in two control subjects, in the form of ovaritis.

The day-by-day comparison between the data for reisolation of salmonella from the various organs in the vaccinated and control subjects, highlighted a significant reduction in colonization by *S. Enteritidis* in the ovaries of the vaccinated birds already at 7 days post-infection ( $P=0,01$ ). The analysis of the reisolation results from the samples at 11th day post-infection highlights a very significant reduction in colonization of the liver, spleen and ovary in the vaccinated birds ( $P<0,01$ ).

Also comparing the overall data of the isolation of the challenge strain from the ovaries in the two groups, the difference is confirmed as extremely significant ( $P < 0,0001$ ), in favour of the vaccinated group.

The study demonstrates that the vaccine BIO-VAC SGP695 with a single administration and at the minimum dosage contemplated confers good cross-protection from challenge with *S. Enteritidis*, at a high infecting titre.

Colonization of the organs of vaccinated hens by *S. Enteritidis* was shown to be significantly reduced over time.

The result obtained is especially important as regards the data concerning the protection conferred on the ovary, given the importance of this organ in the transmission of infection from hen to egg/chick (vertical transmission) and, in the case of hens producing market eggs, the risk of transmission to man via the eggs.

## INTRODUZIONE

BIO-VAC SGP695 è un vaccino vivo attenuato contro la tifoosi aviare avente come principio attivo il ceppo *Salmonella gallinarum/pullorum* SGP695AV<sup>è</sup> (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum o *S. Gallinarum*), capace di conferire protezione verso *Salmonella Gallinarum* (1).

Assieme alla tifoosi aviare un'altra infezione di particolare importanza per l'allevamento avicolo ed in particolare per quello dell'ovaioia è l'infezione da *S. Enteritidis* (*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis) soprattutto per le implicazioni di sanità pubblica connesse alla peculiarità di questo sierotipo di infettare l'ovario e di conseguenza contaminare l'uovo.

Questo sierotipo rappresenta la maggior causa di salmonellosi di origine alimentare nell'uomo a livello mondiale da 20 anni e in questo periodo il più importante veicolo di infezione risulta appunto l'uovo di gallina infetta (2).

*S. Gallinarum* e *S. Enteritidis* appartengono entrambi al sierogruppo O D1 avendo formula antigenica rispettivamente **1,9,12:-:-** e **1,9,12:g,m:-** pertanto è possibile la protezione crociata fra i due serovars.

In passato, diversi studi hanno valutato la cross-protezione di vaccini per salmonella verso i serovar correlati, dimostrando che vaccini vivi per salmonella sono capaci di conferire un certo grado di cross-immunità verso serovars appartenenti allo stesso sierogruppo (3, 4, 5, 6).

Scopo del presente lavoro è stato la valutazione della protezione crociata indotta dalla vaccinazione con BIO-VAC SGP695 nei confronti dell'infezione sperimentale da *S. Enteritidis* in ovaioie, valutando in particolare la capacità di ridurre la colonizzazione dell'ovario, per prevenire la contaminazione dell'uovo per uso alimentare.

## MATERIALI E METODI

### Animali e gruppi sperimentali

Nello studio sono state utilizzate 57 galline ovaioie di razza Hy-line provenienti da un allevamento convenzionale che non attua profilassi vaccinale nei confronti di *Salmonella* spp., prelevate all'età di 14 settimane e trasferite in struttura isolata. Raggiunte le 50 settimane di vita, in piena fase di ovodeposizione, le galline sono state trasferite in stabulario sperimentale, suddivise in due gruppi di 28 e 29 soggetti ognuno e in gabbie senza possibilità di contatto fra i soggetti dei due gruppi.

Gli animali sono stati alloggiati in gabbie lineari per ovaiole con 5 soggetti per gabbia; l'acqua di bevanda è stata fornita *ad libitum* con abbeveratoi a *nipple*; per l'alimentazione, anch'essa *ad libitum* in mangiatoie lineari, è stato utilizzato il medesimo mangime utilizzato nell'allevamento di provenienza degli animali.

Il primo gruppo ha ricevuto un trattamento vaccinale con BIO-VAC SGP695 subito dopo il trasferimento; il secondo gruppo non è stato vaccinato ed ha costituito il gruppo di controllo.

Prima dell'inizio della prova, la sieronegatività di tutti i soggetti in esperimento nei confronti di *S. Enteritidis* è stata verificata mediante l'esecuzione di un test ELISA (kit ELISA X-OVO - Flockscreen® *S. enteritidis* - Guildhay Limited, England).

### **Vaccinazione**

È stato utilizzato il vaccino BIO-VAC SGP695 il cui principio attivo è costituito dal ceppo di *Salmonella gallinarum/pullorum* SGP695AV<sup>c</sup> attenuato mediante la tecnica di adattamento su eterofili di pollo (8,9).

Per la somministrazione agli animali il vaccino liofilizzato è stato ricostituito in acqua in modo da ottenere un titolo di circa  $2 \times 10^8$  UFC per millilitro di sospensione, pari al minimo della dose vaccinale prevista.

Un millilitro di vaccino ricostituito è stato somministrato per via orale mediante siringhe senz'ago, secondo il seguente schema:

- gruppo vaccinato: una sola vaccinazione all'età di 50 settimane
- gruppo di controllo: nessun trattamento.

### **Infezione sperimentale**

A circa 3 settimane dalla vaccinazione, tutti i soggetti in esperimento sono stati infettati per via orale con il ceppo selvaggio di campo FCB 356 di *S. Enteritidis* (fagotipo 4).

Per l'infezione è stata utilizzata una sospensione batterica ottenuta raccogliendo con soluzione fisiologica sterile il ceppo liofilizzato FCB 356 seminato e coltivato su TSA (Tryptone Soy Agar, Oxoid Ltd) per 24 ore a 37°C.

Un millilitro di questa sospensione è stato somministrato a ciascun soggetto e subito dopo titolato mediante semina su piastra determinando un titolo reale di  $1,3 \times 10^9$  UFC/ml.

### **Osservazioni cliniche**

Tutti i soggetti in esperimento sono stati tenuti in osservazione clinica quotidiana a partire dal giorno dell'infezione *challenge* fino a 11 giorni post-infezione (gg.p.i), al fine di valutare l'insorgenza di sintomi ad essa correlati

### **Esame batteriologico e anatomopatologico**

Ad intervalli prestabiliti, corrispondenti a 4, 7 ed 11 giorni dopo l'infezione sperimentale, un ugual numero di soggetti di ciascun gruppo è stato soppresso e sottoposto agli esami di laboratorio.

Nello specifico da ciascun soggetto sono stati prelevati, in condizioni di asepsi, il fegato, la milza e l'ovario per l'esecuzione delle indagini batteriologiche per ricerca di *Salmonella* spp..

La ricerca è stata condotta mediante la procedura basata sul metodo ISO 6579:2002/AMD1:2007 (pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata – arricchimento selettivo in Modified semisolid Rappaport Vassiliadis – isolamento in BGA - Brilliant Green Agar e XLD - Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar).

Sui medesimi organi è stato eseguito anche l'esame anatomico-patologico per l'individuazione di lesioni macroscopiche ascrivibili a salmonella.

### Analisi statistica

I risultati degli esami batteriologici sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il Test esatto di Fisher per il confronto tra i dati relativi alla colonizzazione dei diversi organi nei soggetti vaccinati e nei controlli.

## RISULTATI

### Osservazioni cliniche

A seguito del *challenge* gli animali non hanno manifestato sintomi, fatta eccezione per un soggetto del gruppo controllo che ha presentato abbattimento, pallore della cresta ed anoressia a 7 gg.p.i. e che nella stessa data è stato soppresso per far parte del gruppo destinato agli esami di laboratorio.

### Indagini batteriologiche e anatomico-patologiche

I risultati degli esami batteriologici per *Salmonella* spp., con l'annotazione delle lesioni di rilievo, sono riportati nelle tabelle 1-3. I risultati batteriologici sono presenti anche nei grafici 1-4.

**Tabella 1: positività per *Salmonella* spp. 4° giorno post-infezione**

Vaccinati				Controlli			
N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario	N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario
1	+	+	+	1	+	+	+
2	+	+	+	2	+	+	+
3	+	+	+	3	+	+	+
4	+	+	+	4	+	+	+
5	+	+	+	5	+	+	+
6	+	+	-	6	+	+	+
7	+	+	+	7	+	+	+
8	+	+	+	8	+	+	+
9	+	-	-	9	+	+	+
10	+	+	+	10	+	+	+
<b>Pos./tot.</b>	<b>10/10</b>	<b>9/10</b>	<b>8/10</b>	<b>Pos./tot.</b>	<b>10/10</b>	<b>10/10</b>	<b>10/10</b>

**Tabella 2: positività per *Salmonella* spp. 7° giorno post-infezione**

Vaccinati				Controlli			
N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario	N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario
1	+	+	+	1 <sup>A</sup>	+	+	+
2	+	+	+	2	+	+	+
3	+	+	-	3	+	+	+
4	-	-	-	4	+	+	+
5	+	+	+	5	+	+	+
6	+	-	-	6	+	+	+
7	+	+	-	7	+	+	+
8	+	+	+	8 <sup>B</sup>	+	+	+
9	-	-	-	9	+	-	+
10	-	-	-	10	+	+	+
<b>Pos./tot.</b>	<b>7/10</b>	<b>6/10</b>	<b>4/10</b>	<b>Pos./tot.</b>	<b>10/10</b>	<b>9/10</b>	<b>10/10</b>

<sup>A</sup> ovarite, oviduttite, peritonite;

<sup>B</sup> ovarite

**Tabella 3: positività per *Salmonella* spp. 11° giorno post-infezione**

Vaccinati				Controlli			
N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario	N° soggetto	Fegato	Milza	Ovario
1	+	+	-	1	+	+	-
2	-	+	-	2	+	+	+
3	-	-	-	3	+	+	+
4	+	+	-	4	+	+	+
5	-	-	-	5	+	+	+
6	-	-	-	6	+	+	+
7	-	-	-	7	+	+	+
8 <sup>C</sup>	-	-	-	8	+	+	-
<b>Pos./tot.</b>	<b>2/8</b>	<b>3/8</b>	<b>0/8</b>	9 <sup>C</sup>	+	+	+
				<b>Pos./tot.</b>	<b>9/9</b>	<b>9/9</b>	<b>7/9</b>

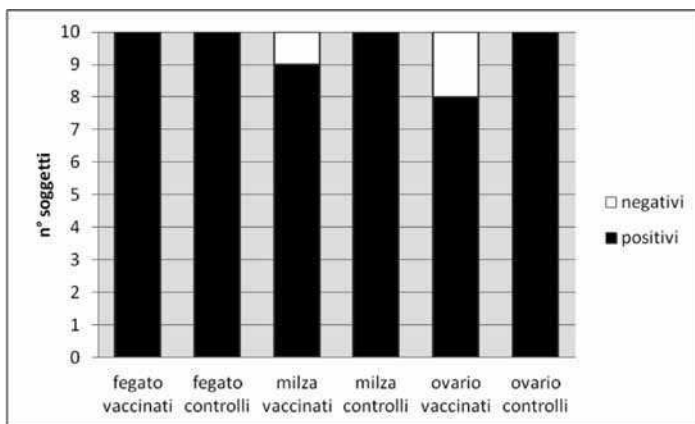
<sup>C</sup> peritonite

### Analisi statistica

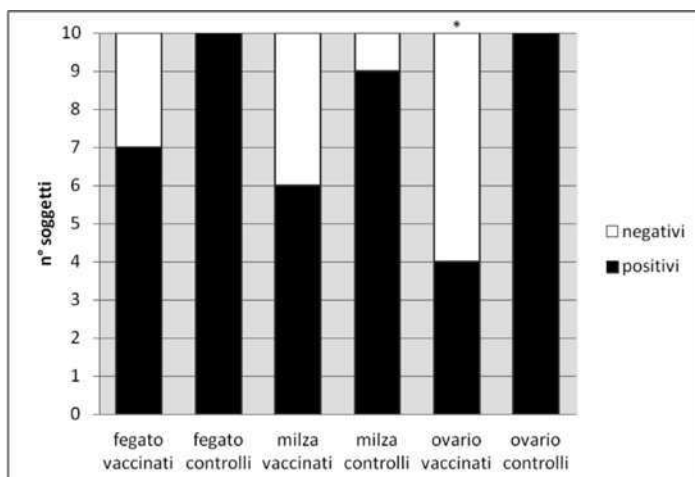
Il confronto giorno per giorno tra i dati relativi al reisolamento di salmonella dai diversi organi nei soggetti vaccinati e nei controlli, effettuato con Test esatto di Fisher, ha evidenziato una significativa riduzione ( $P=0,01$ ) nei vaccinati della colonizzazione da *S. Enteritidis* nell'ovario già dopo 7 gg.p.i.(grafico 2).

Analogamente l'analisi dei risultati del reisolamento dai campioni dell'11° gg.p.i ha evidenziato una riduzione nella colonizzazione di fegato, milza ed ovario dei vaccinati altamente significativa (rispettivamente  $P$  uguale 0,0023, 0,0090 e 0,0023 - grafico 3). Il confronto dei risultati complessivi relativi all'isolamento dall'ovario a 4, 7 e 11 gg.p.i. conferma una differenza estremamente significativa a favore del gruppo vaccinato ( $P=0,00005$  – grafico 4).

**Grafico 1: positività per *Salmonella* spp. 4° giorno post-infezione**

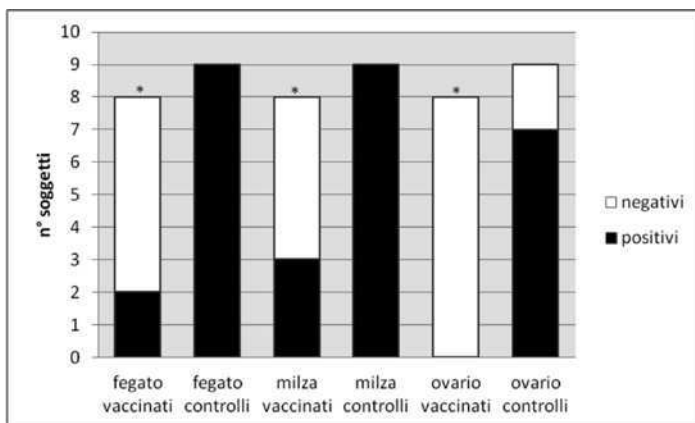


**Grafico 2: positività per *Salmonella* spp. 7° giorno post-infezione**



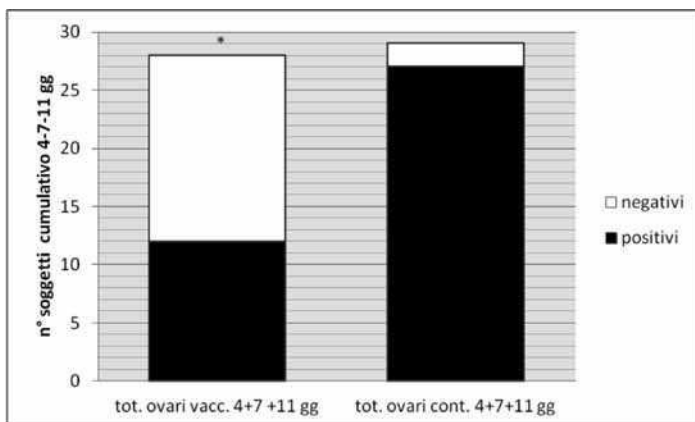
\* differenza significativa rispetto al gruppo controllo ( $P=0,01$ )

**Grafico 3: positività per *Salmonella* spp. 11° giorno post-infezione**



\* differenza altamente significativa rispetto ai gruppi controllo ( $P < 0,001$ )

**Grafico 4: positività per *Salmonella* spp.: risultati complessivi da ovario 4°-7°-11° giorno post-infezione**



\* differenza estremamente significativa rispetto al gruppo controllo ( $P < 0,0001$ )

## DISCUSSIONE RISULTATI

L'infezione sperimentale con *S. Enteritidis*, che solitamente in condizioni di campo non provoca forme sintomatiche, ha determinato la comparsa di malattia in un soggetto del gruppo controllo probabilmente a causa dell'elevato titolo infettante somministrato.

Inoltre in 3 soggetti del gruppo controllo sono state evidenziate lesioni anatomopatologiche a carico di ovario e peritoneo specifiche da salmonella come confermato dall'esame batteriologico.

Al contrario nel gruppo vaccinato, all'unico riscontro di lesione macroscopica (peritonite) è corrisposto un esame batteriologico negativo.

I risultati degli esami batteriologici per la ricerca di *Salmonella* spp. hanno permesso di evidenziare l'efficacia della vaccinazione con BIO-VAC SGP695 nel ridurre la colonizzazione a livello di organi viscerali a diversi intervalli dopo il *challenge* (4, 7 e 11 gg.p.i.).

Tale riduzione è risultata statisticamente significativa già a partire da 7 gg.p.i. per l'ovario ed 11 gg.p.i. per milza e fegato.

La vaccinazione si è dimostrata efficace soprattutto nella capacità di portare alla completa negativizzazione degli ovari degli animali vaccinati (0/8) rispetto ai controlli (7/9) esaminati a 11 gg.p.i.

Il risultato assume ancor più rilievo considerando che l'infezione è stata effettuata con un titolo ( $1,3 \times 10^9$  UFC) molto più elevato di quello di analoghi studi (3, 4, 6, 7) e di gran lunga superiore a quello che si può verificare in condizioni di campo.

La riduzione della colonizzazione di organi interni e ovario è assolutamente comparabile, se non maggiore, di quella ottenuta da altri Autori con vaccini vivi attenuati omologhi *S. Enteritidis* (6).

## CONCLUSIONI

Lo studio è in grado di dimostrare che il vaccino BIO-VAC SGP695, in somministrazione singola e al dosaggio minimo previsto, conferisce una buona protezione crociata dall'infezione sperimentale ad alto titolo infettante con *S. Enteritidis*.

La colonizzazione degli organi da parte di *S. Enteritidis* nelle galline vaccinate si è dimostrata significativamente ridotta nei tempi.

È soprattutto da sottolineare il risultato relativo alla protezione conferita all'ovario vista l'importanza che quest'organo riveste nel passaggio dell'infezione da gallina a uovo/pulcino (trasmissione verticale) e nel caso della gallina da uova da consumo per il rischio di trasmissione all'uomo per via alimentare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Legretto M., Circella E., Caroli A., Pugliese N., Meliota F., Lozito P., Camarda A. "Innocuità ed efficacia protettiva del ceppo attenuato *Salmonella gallinarum* SGP695AV nel pollo" Atti 51° Convegno Annuale SIPA Salsomaggiore Terme (PR) 11-12 ottobre 2012 – pp. 298-308
2. Gantois I, Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Gast R., Humphrey T.J. & Van Immerseel F. (2009) Mechanism of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol Rev 33 718-738
3. Barrow P.A., Lovell M.A. Berchieri A. (1990). Immunization of laying hens against *Salmonella enteritidis* with live attenuated vaccines. Vet Rec. 126, 241-242
4. Barrow P.A., Lovell M.A. Berchieri A. (1991). The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella enteritidis* phage type 4. Avian Pathology, 20 681-692



5. Chacana P.A. and Terzolo H.R. (2006) Protection Conferred by a Live *Salmonella* Enteritidis Vaccine Against Fowl Typhoid in Laying Hens. *Avian Disease* 50 (2): 280-283
6. Gantois I, Ducatelle R. Timbermont L., Boyen F., Bohez L. Haesebrouck F., Pasmans F., van Immerseel F. (2006) Oral immunization of laying hens with the live vaccine strains of TAD salmonella vac® E and TAD Salmonella vac® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 24 6250-6255
7. Nassar T.J., Al-Nakhli H.M. and Al-Ogaily Z.H (1994) Use of live and inactivated *Salmonella* enteritidis phage type 4 vaccine to immunize laying hens against experimental infections. *Rev.sci.tech. Off. Inte. Epiz.*, 13 (3) 855-867
8. Kramer TT. (1998). Effects of heterophil adaptation on *Salmonella enteritidis* fecal shedding and egg contamination. *Avian Dis.*, 42:6-13.
9. Kramer TT., Hirl M. (2001) Loss of virulence by heterophil-adapted *Salmonella pullorum*. *Avian Dis.*, 45:453-455.

## VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FITOCSC® NEI CONFRONTI DI CEPPI DI *E. COLI* E *SALMONELLA* SPP. ANTIBIOTICO-RESISTENTI ISOLATI DAL POLLAME

Stella S.<sup>1</sup>, Martino P. A.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>3</sup>, Tirloni E.<sup>1</sup>, Cossetini C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano.

<sup>3\*</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì.

<sup>4</sup> Chemifarma SpA.

Numerosi studi hanno evidenziato, negli ultimi anni, le potenzialità dell'utilizzo degli estratti vegetali e degli oli essenziali quali sostitutivi dell'uso di antibiotici quali promotori di crescita e regolatori della microflora intestinale nel settore zootecnico. Tra gli effetti principali risulta particolarmente interessante l'attività inibitoria nei confronti di microrganismi patogeni antibiotico-resistenti vista la diffusione crescente di questo fenomeno.

Questo studio preliminare è stato svolto allo scopo di valutare l'efficacia antibatterica *in vitro* del prodotto Fito CSC®, formulato per l'aggiunta all'acqua di bevanda negli allevamenti avicoli, nei confronti di ceppi di batteri antibiotico-resistenti di provenienza avicola. Il prodotto contiene prodotti naturali botanicamente definiti: Cassia (*Cinnamomum aromaticum*; contenuto in trans-cinnamaldeide pari al 4.60%), Origano (*Origanum vulgare*) e Timo (*Thymus vulgaris*) (titolo totale 100.000 mg/kg), additivi organolettici, sostanze aromatiche e acido citrico (11.000 mg/kg) con funzione conservante. L'analisi preliminare del prodotto ha dato i seguenti risultati: sostanza secca 13%, fibra grezza 0.5%, proteina grezza < 0.5%, grassi 0%, ceneri 5%, Na 1,9%, Cl 3%, pH 4.89.

Per il test sono stati utilizzati 6 ceppi di *Escherichia coli* e 1 ceppo di *Salmonella* Typhimurium isolati da avicoli e selezionati per la presenza di resistenza antibiotica, come riportato nella tabella.

N°	Specie	Origine	Sensibilità				
			Enrofloxacin	Amoxicillina	Sulfametossazolo/ Trimetoprim	Gentamicina	Ceftiofur
1	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	R	S	R
2	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	R	R	S
3	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	S	S	R
4	<i>E. coli</i>	Pollastra	R	R	S	S	R
5	<i>E. coli</i>	Gallina ovaioia	R	R	R	S	S
6	<i>E. coli</i>	Broiler	R	R	R	S	S
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Quaglia	S	R	S	S	S

Sono state effettuate 2 serie di prove con differenti metodiche:

1<sup>a</sup> prova – Valutazione dell’abbattimento microbico su terreno solido contenente diverse concentrazioni di prodotto. Cinque aliquote di terreno Muller-Hinton Agar (MH, Oxoid) sono state preparate e addizionate, dopo la sterilizzazione, con diverse concentrazioni di prodotto: 0.25‰, 0.50‰, 0.75‰, 1‰, 2‰. È stata inoltre preparata un’aliquota di terreno non additivato quale controllo negativo.

Per ogni ceppo utilizzato, è stata allestita una sospensione a titolo noto in soluzione diluente sale/triptone (9‰); sono state quindi allestite le diluizioni seriali, che sono state seminate per inglobamento nei terreni sopra descritti. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore; successivamente è stata effettuata la conta microbica e calcolato l’abbattimento logaritmico rispetto alle piastre di controllo.

2<sup>a</sup> prova – Valutazione dell’inibizione di crescita in terreno liquido. Sono state preparate diverse serie di provette contenenti 5 ml di brodo Muller-Hinton addizionato con il prodotto ai seguenti livelli di diluizione 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 e 1/2560; è stata inoltre preparata una serie di provette contenenti il brodo non additivato, da utilizzare come controllo negativo. Per ogni ceppo batterico, è stata preparata una sospensione a titolo noto, che è stata diluita e inocolata nelle provette (concentrazione di circa 10<sup>6</sup> ufc/ml). Le provette sono state quindi incubate a 37°C per 24 ore. L’eventuale presenza di microrganismi vitali nel brodo è stata valutata prelevando 5 aliquote da 20 µl da ogni provetta, che sono state seminate per apposizione su piastre di MH agar, incubate a 37°C per 24 ore. La crescita microbica è stata valutata utilizzando il seguente punteggio: ++ (crescita di una patina batterica); + (crescita di colonie visibili); - (assenza di crescita).

Entrambe le prove sono state effettuate in doppio su tutti i ceppi.

Risultati - 1<sup>a</sup> prova. L’additivazione del terreno con il prodotto ha evidenziato un effetto antimicrobico nei confronti dei ceppi testati alla concentrazione di 2‰: l’abbattimento logaritmico medio dei ceppi di *E. coli* è stato di 0.85 Log (d.s. = 0.37), mentre nel caso del ceppo di *Salmonella* Typhimurium è stato pari a 0.6 Log; le concentrazioni inferiori non hanno evidenziato effetti significativi.

2<sup>a</sup> prova. L’inoculo del brodo con diverse diluizioni del prodotto ha permesso di rilevare un’attività battericida evidente a partire dalla diluizione 1/320, almeno per alcuni dei ceppi testati, corrispondente ad una concentrazione del prodotto di circa 3‰; alla diluizione di 1/160 (pari a circa 6‰) l’effetto battericida è apparso molto marcato per tutti i ceppi testati. I risultati sono osservabili nella tabella seguente.

Diluizione	20	40	80	160	320	640	1280	2560
Concentrazione (ml/100 l)	5000	2500	1250	625	313	156	78	39
1	-	-	-	-	++	++	++	++
2	-	-	-	+	++	++	++	++
3	-	-	-	-	+	++	++	++
4	-	-	-	-	+	++	++	++
5	-	-	-	+	+	++	++	++
6	-	-	-	-	++	++	++	++
7	-	-	-	-	++	++	++	++

Questo studio preliminare ha permesso di evidenziare l'effetto antimicrobico del prodotto sia su terreno solido che in brodo nei confronti di ceppi antibiotico-resistenti di *E. coli* e *Salmonella*. I dati ottenuti permettono di individuare un intervallo nel quale misurare la concentrazione attiva per un effetto battericida e batteriostatico del prodotto, e mettere così a punto il migliore dosaggio per esercitare un effetto positivo sull'equilibrio della microflora intestinale degli animali trattati. L'utilizzo di miscele di oli essenziali ed essenze vegetali appare come una strategia promettente nel campo dell'additivazione alimentare zootecnica, vista la combinazione di diverse attività positive (effetto antiossidante, batteriostatico, microbica) e i potenziali effetti sinergici delle diverse componenti attive.



# **INDICE DEGLI AUTORI**



Agnoletti F. 115, 120, 126, 130, 165  
 Ardizio M., 95

Bacchin C. 115  
 Baldasso E. 145  
 Bano L. 115, 120, 126, 130, 165  
 Bonci M. 136  
 Borrelli L. 142  
 Bozzo G. 151

Cagnardi P., 79  
 Camarda A. 49, 151  
 Caputo V. 142  
 Caroli A. 151  
 Casagrande-Proietti P. 171  
 Castellina C., 95  
 Catania S. 145, 165  
 Catelli E. 136  
 Cecchinato M. 136  
 Cesca A. 130  
 Circella E. 151  
 Cossettini C. 193

Da Ros D., 35  
 De Zan G. 126, 130  
 Di Pineto L. 49, 142  
 Dotto G. 156  
 Drigo I. 115, 120, 126, 130, 165

Fagioni M. 130  
 Ferro T. 115, 120  
 Fioretti A. 142  
 Fontana M.C. 184  
 Fracas V. 126  
 Franciosini M. 156  
 Franciosini M. P. 171  
 Furlan G. 120

Gallazzi D. 182  
 Gargiulo A. 142  
 Gerchman I. 145  
 Giacomelli M. 156, 176  
 Giacomelli S. 182  
 Gavazzi L., 25  
 Giovanardi D. 115, 136, 156  
 Gobbo F. 165  
 Grilli G. 156, 171, 182

Legretto M. 151  
 Levisohn S. 145  
 Lozito P. 184  
 Lupini C. 136  
 Lysnyansky I. 145

Martino P. A. 193  
 Maschio M. 176  
 Massi P. 193  
 Meliota F. 184  
 Merialdi G. 184  
 Mevius D., 61  
 Mikula I. 145  
 Montesissa C., 85  
 Morandini E. 25, 136  
 Moret C. 130, 165

Pascoletti S. 130, 165  
 Pepe P. 142  
 Pesente P. 136  
 Perrella A., 103  
 Piccirillo A. 156, 171, 176  
 Pozzi M. 182  
 Pugliese N. 151

Rinaldi L. 142  
 Rodio S. 145  
 Romito D. 151  
 Rosato G. 142  
 Rossi G. 136  
 Russo T. P. 142

Scebba S. 182  
 Soprano M. 182  
 Stella S. 193

Tacconi G. 171  
 Terregino C., 45  
 Tirloni E. 193  
 Tonon E. 120  
 Tosi G. 193  
 Trevisiol K. 120  
 Vascellari M. 126  
 Vas Z. 182  
 Villa R., 71  
 Viel L. 126





MERIAL - Uno sguardo lungimirante...

*Salmonella* Enteritidis  
&  
*Salmonella* Typhimurium

chiedi consiglio al tuo Servizio Veterinario



...e le uova sono più sicure

# Protectotype

Tutto ciò  
di cui hai bisogno  
per **proteggerti**  
dalla **Bronchite**  
**Infettiva**



MSD Animal Health S.r.l.  
Via Fratelli Cervini, Centro Direzionale Milano Due  
Palazzo Carovà, 20090 Segrate (MI)

 **MSD**  
Animal Health

Perché sappiamo  
**cosa conta veramente per te**



***Innovazione - Protezione - Risultati***

**Chiedi informazioni al tuo Veterinario**

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

**zoetis**





INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI : ANIMAL HEALTH PRODUCT



## > RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.



Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfele da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA  
INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE  
E STABILIMENTO  
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT  
Via Affarosa 4  
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:  
+39 0522 640711

FAX:  
+39 0522 649757  
+39 0522 640716

info@treivet.com  
www.treivet.com





Finito di stampare  
nel mese di marzo 2013  
da La Ducale Srl - Parma