

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA *IN VITRO* DI
ANTEC VIRKON S®, ANTEC FARM FLUID S® E ANTEC AMBICIDE®
NEI CONFRONTI DI ALCUNI CEPPI BATTERICI DI ORIGINE AVIARE**

L. Fiorentini¹, G. Tosi¹, P. Massi¹, M.A. Beghian², S. Zamboni³

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì

²Antec international ltd. ³Nuove tecnologie

Parole chiave: disinfettanti chimici, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, efficacia *in vitro*

In vitro efficacy of Antec Virkon S®, Antec Farm Fluid S® and Antec Ambicide® on some avian bacterial strains

Key words: chemical disinfectants, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, in vitro efficacy

Summary: In vitro efficacy of three formulated disinfectants against some bacterial pathogenic strains isolated in poultry farms was evaluated. The study was conducted in distilled water only and in presence of hard water and organic material. Following the manufacturer's recommendations, all products assessed were able to eliminate the tested strains also in presence of hard water and organic matter.

Correspondence: Fiorentini L. – Borsista presso Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1, 47100 Forlì – Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Le procedure di biosicurezza comprendono tutte le misure preventive di natura gestionale ed igienico-sanitaria da adottare per prevenire l'introduzione e la circolazione di agenti patogeni in allevamento (3). Una delle principali componenti della biosicurezza è l'applicazione di piani di pulizia e disinfezione di ambienti, attrezzature, mezzi di trasporto, equipaggiamenti del personale (1). Un buon disinfettante deve essere in grado di agire in presenza di materiale organico (difficile da rimuovere completamente con le operazioni di lavaggio) e di acque "dure" (tipiche del nostro territorio) (2). Il presente studio ha lo scopo di valutare l'efficacia *in vitro* di tre disinfettanti chimici nei confronti di alcuni ceppi batterici tra i più diffusi e patogeni in campo avicolo. Le prove sono state eseguite sia in condizioni ideali per l'azione dei disinfettanti, sia in condizioni reali di campo per la presenza di sostanza organica e di acqua dura.

Materiali e metodi

Ceppi batterici: sono stati impiegati i seguenti ceppi batterici: 1) *Salmonella enteritidis*, isolato in un gruppo di pulcini in corso di malattia caratterizzata da mortalità e lesioni tipiche della forma setticemica. 2) *Escherichia coli*, isolato da un gruppo di broilers colpito da una sindrome respiratoria da virus della bronchite infettiva complicata, appunto, da una forma setticemica da E.coli. 3) *Staphylococcus aureus*, isolato da un gruppo di pollastre colpite da artrosinovite tibiotarsica.

Le colture batteriche sono state preparate in brodo BHI e sottoposte a conteggio in piastra su Agar Triptoso. Le brodocolture sono state in seguito diluite in acqua distillata fino a raggiungere la concentrazione finale di 500X10⁶ cfu/ml. Limitatamente al presidio Antec Virkon S è stata eseguita una prova supplementare impiegando 500 X10⁹ cfu/ml.

Disinfettanti: le principali caratteristiche dei disinfettanti impiegati sono riportate in tabella 1.

Prova di efficacia: le diluizioni dei disinfettanti sono state eseguite in acqua distillata fino a 10 volte la concentrazione finale richiesta. Per la prova in condizioni "sterili", 2ml di ogni soluzione disinfettante

sono stati aggiunti a 16 ml di acqua distillata sterile e a 2ml di brodocoltura in modo da ottenere la concentrazione finale richiesta (1:100 e 1:1000 per E.coli e S.enteritidis; 1:50 e 1:500 per S.aureus). Ad intervalli di 5, 15 e 30 minuti, 0,1ml di soluzione è stata prelevata e messa a contatto con 0,9 ml di soluzione "neutralizzante" (formata da sodio tiosolfato, Tween 80, L-istidina e lecitina); 0,02 ml di quest'ultima soluzione è stata distribuita su piastre di Agar Hektoen e Agar sangue (per S.aureus), incubate poi a 37°C. Dopo 24 ore di incubazione è stata eseguita la lettura delle colonie batteriche eventualmente sviluppatesi. Per la prova in presenza di acqua dura e materiale organico, la soluzione disinfettante è stata diluita con una soluzione formata da 4 ml di acqua distillata sterile e 12 ml di una sospensione al 5% di lievito in acqua dura (0,304 gr di CaCl₂ e 0,139 gr. di MgCl₂ in 1 litro di acqua distillata). Prima dell'aggiunta della brodocoltura, le due soluzioni sono state miscelate tra loro per 45 minuti.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 2-5.

Discussione

I tests confermano l'efficacia *in vitro* dei tre presidi alle diluizioni d'uso consigliate dalla ditta produttrice. Soprattutto per Antec Virkon S® e Antec Farm Fluid S® destano interesse anche i risultati ottenuti a diluizioni superiori. Trattandosi di dati preliminari e non di veri e propri tests quantitativi è azzardato prevedere un loro impiego in campo a tali concentrazioni (1:500 o 1:1000). Positiva è inoltre l'azione di Antec Virkon S® nei confronti di *S.enteritidis* ed *E.coli* in presenza di concentrazioni batteriche estremamente elevate (Tabella 5). Le prove confermano l'efficacia dei tre composti in presenza di acqua dura e di materiale organico. E' da sottolineare inoltre, la loro rapidità d'azione, evidente dopo soli 5 minuti di contatto con le colture batteriche.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il sig. Silvano Bussi, tecnico di laboratorio della Sezione IZSLER di Forlì.

Bibliografia

1. Jeffrey J.S. (1997) "Biosecurity rules for poultry flocks". World Poultry, Misset volume 13, 101.

2. Russel A.D., Hugo H.B. (1987) "Chemical disinfection" in: Linton A.H.: Disinfection in veterinary and farm practice, Blackwell Scientific Publication – UK, 12-42.
3. Shane S. (1995) "Decontamination of housing and equipment" in: American Association of Avian Pathologists: Biosecurity in the poultry industry. University of Pennsylvania, New Bolton Center 35-41.

Tabella 1: Principali caratteristiche dei disinfettanti impiegati

Table 1: Characteristics of disinfectants used

Nome commerciale	Composizione	Diluizioni d'uso*
Antec Virkon S®	Formulazione multiattiva stabilizzata a base di perossidi, tensioattivi, catalizzatori inorganici e sostanze ad azione tampone	Da 1:100 a 1:200
Antec Farm Fluid S®	Miscela di derivati acidi del catrame distillati ad alto punto di ebollizione, acidi organici e tensioattivi	Da 1:100 a 1:200
Antec Ambicide®	Miscela di derivati terziari alchil-amminici, sali quaternari d'ammonio a doppia catena, sinergizzanti ad azione schiumogena	Da 1:50 a 1:200

*Raccomandate dalla ditta produttrice in funzione del tipo di disinfezione.

Tabella 2: Efficacia in vitro di Antec Virkon S®

Table 2: In vitro efficacy of Antec Virkon S®

Temp °	<i>S.enteritidis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica
5 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
15 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:150) 0 (1:500)

°n. di colonie batteriche sviluppate e, tra parentesi, diluizione del disinfettante

Tabella 3: Efficacia in vitro di Antec Farm Fluid S®

Table 3: In vitro efficacy of Antec Farm Fluid S®

Temp °	<i>S.enteritidis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica
5 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
15 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)

Tabella 4: Efficacia in vitro di Antec Ambicide®

Table 4: In vitro efficacy of Antec Ambicide®

Temp °	<i>S.enteritidis</i>		<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica	Sol.sterile	Acqua dura + s.organica
5 min	0 (1:100) 59 (1:1000)	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 1 (1:1000)	0 (1:100) 17 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
15 min	0 (1:100) 14 (1:1000)	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 1 (1:1000)	0 (1:100) 13 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 1 (1:1000)	0 (1:100) 13 (1:1000)	0 (1:50) 0 (1:500)	0 (1:50) 0 (1:500)

Tabella 5: Efficacia in vitro di Antec Virkon S® in presenza di 500X10⁹ cfu/ml

Table 5: In vitro efficacy of Antec Virkon S® using 500X10⁹ cfu/ml

Tempo	<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica	Sol. sterile	Acqua dura + s. organica
5 min	0 (1:100) >300 (1:1000)	0 (1:100) 46 (1:1000)	0 (1:100) 5 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)
15 min	0 (1:100) 9 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)
30 min	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	0 (1:100) 0 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)	>300 (1:100) >300 (1:1000)

COMUNICAZIONE 17

METODICA ELISA PER L'EVIDENZIAMENTO DI ANTICORPI ANTI-INFLUENZA H7 IN SIERI SPERIMENTALI E DI CAMPO

P. Cordioli, G. Sala, A. Moreno-Martin, A. Lavazza, S. Rigola, S. Grazioli, E. Brocchi

Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertyni" - Brescia

Parole chiave: ELISA, anticorpo monoclonale anti-H7, sierologia

ELISA Test for detection of influenza H7 antibodies in experimental and field sera

Key words: ELISA, Anti H7 monoclonal antibody, serology

Summary: Using a MAb specific for the H7 of the 2676 LPAI an ELISA test has been developed; the test is able to assess specific H7 antibodies in avian sera. The H7 ELISA has shown a 99% concordance of results with the classical HI test.

Correspondence: P. Cordioli, Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertyni" – Via A. Bianchi 9, 25124 Brescia - diagnvir@bs.izs.it

Introduzione

La recente epizoozia di Influenza da ceppi H7N1 ha determinato un consistente aumento di indagini virologiche e sierologiche. Si è di conseguenza evidenziata la necessità di avere a disposizione un'altra metodica sierologica da utilizzare parallelamente alla inibizione della emoagglutinazione, metodo normato descritto nel D.P.R. 656/96, per controllare sieri dubbi, emolitici o per evidenziare anticorpi nel tuorlo (materiale che prevede diluizioni maggiori per essere utilizzato in inibizione della emoagglutinazione)

Materiali e metodi

Virus: per la produzione di anticorpi monoclonali è stato utilizzato il ceppo di influenza H7N1 (2676) isolato nel marzo 1999 da un allevamento di tacchini da carne della Provincia di Verona e caratterizzato come ceppo a bassa virulenza dal Centro Europeo per i virus influenzali di Weybridge.

Anticorpi Monoclonali: il liquido allantoideo prelevato tra la 48^a e la 72^a ora dall'inoculazione è stato ultracentrifugato su cuscino di saccarosio e inoculato in topi balb/c previa emulsione con adiuvante di Freund completo. Dopo un richiamo con Freund incompleto 4 settimane dopo il primo inoculo, gli animali sono stati richiamati con antigene non adiuvato per via intraperitoneale tre giorni prima della fusione degli splenociti con cellule NS0 secondo metodica standardizzata. Lo screening degli ibridomi è stato eseguito in ELISA su antigene H7N1, H3N2, Virus della Bronchite Infettiva ceppo Mass 41 e liquido allantoideo prelevato da uova SPF non inoculate. La specificità degli anticorpi è stata inoltre valutata in prove di competizione con sieri sperimentali di pollo monospecifici per H7, H5, H9, H6.

Sieri sperimentali: mediante infezioni sperimentali in animali SPF di età variabile dai 20 giorni ai 6 mesi sono stati prodotti sieri iperimmuni specifici per H7, H5, H6, H9. Per ciascun sierogruppo sono stati usati 8 animali SPF inoculati per via endovenosa con 0,5 ml di liquido allantoideo e richiamati con il doppio della dose per via intramuscolare 25 giorni dopo. Il salasso in bianco è stato effettuato circa 15 giorni dopo secondo richiamo.

Animali SPF di 20 giorni sono stati vaccinati con vaccino sperimentale H7N1; 4, 6 e 8 settimane dopo un'unica somministrazione di vaccino sono stati salassati e sottoposti a challenge per via intratracheale con ceppo omologo ad alta patogenicità (ceppo 13474). Dopo due settimane gli animali sono stati di nuovo salassati. In totale per la prova di vaccinazione sono stati utilizzati 100 animali SPF ed esaminati 248 sieri.

Sieri di campo: per la validazione del test sono stati utilizzati 820 sieri esaminati per la routine diagnostica dell'influenza aviaria presso il Laboratorio Virologia Specializzata dell'IZSLER. Tra questi vi erano anche 27 sieri di galline ovaiole sieropositive per infezione naturale con ceppi a bassa virulenza e, inoltre, 20 campioni di tuorlo proveniente dallo stesso allevamento.

Test ELISA specifico per anticorpi H7: piastre per ELISA Nunc maxisorp vengono adsorbite con antigene H7N1 parzialmente purificato alla diluizione d'uso in carbonato-bicarbonato pH 9,6 per una notte a 4°C. I sieri vengono esaminati in due diluizioni 1/5 e 1/10, aggiungendo in ogni piastra i sieri di controllo positivo e negativo e prevedendo dei pozzetti di reazione 100% in cui non viene aggiunto alcun siero; contemporaneamente ai sieri in esame viene aggiunto il monoclonale 3G1 opportunamente diluito. Dopo 1