

FARMACOSENSIBILITÀ DI CEPPI DI *RIEMERELLA ANATIPESTIFER* ISOLATI IN ALLEVAMENTI COMMERCIALI DI TACCHINI E POLLI DA CARNE

Zandonà L.^{1,2}, Agnoletti F.¹, Puiatti C.¹, Pozzobon G.¹, Ceruti R.³, Giovanardi D.⁴, Bano L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba (TV)*

²*Scuola di Specializzazione in Tecnologia e Patologia delle Specie Avicole, del Coniglio e della Selvaggina, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano*

³*Gesco sca, Via Bonfandina 9, 25046 Cazzago San Martino (BS)*

⁴*Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi 5, 37132 San Michele Extra, Verona*

Summary

Riemerella anatipestifer infection is an important reemerging issue for the Italian poultry industry. The minimum inhibitory concentration (MIC) of nine antimicrobials (amoxicillin, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, penicillin G, streptomycin, tetracycline, tilmicosin, trimethoprim/sulfamethoxazole) was determined against 102 field strains of *Riemerella anatipestifer* isolated in Italy in 74 meat turkeys and 28 meat chickens commercial farms, from 2012 to 2015. MICs were determined by broth microdilution method, according to the CLSI document M07-A10 (2015). The lowest MIC90 were observed for beta-lactams (ceftiofur, penicillin G and amoxicillin) and the highest for tilmicosin. The MIC90 of ceftiofur, penicillin G and tetracycline resulted lower than the values recorded in China and Taiwan for duck isolates.

INTRODUZIONE

Riemerella anatipestifer (RA) è considerato un importante patogeno per gli allevamenti avicoli mondiali. Storicamente l'infezione è associata a polisierositi e setticemie che colpiscono prevalentemente gli anatidi di 1-8 settimane di vita (5). In Italia i primi focolai di riemerellosi sono stati descritti in tacchini e polli da carne alla fine degli anni 70. In questi episodi la sintomatologia era prevalentemente nervosa e, nel tacchino, era sporadicamente accompagnata ad oftalmi bilaterali (4,6). Dopo quelle prime segnalazioni la malattia ha continuato ad essere presente negli allevamenti italiani di tacchini da carne con andamento altalenante, mentre nel pollo veniva segnalata nuovamente solo a partire dal 2012, in associazione ad importanti quadri meningoencefalici (1). Il contenimento della malattia è affidato a trattamenti profilattici o terapeutici. Quelli profilattici sono basati sull'impiego di vaccini batterici inattivati la cui efficacia dipende dalla variabilità antigenica dei ceppi circolanti (sierotipi), mentre il trattamento con antimicrobici viene attuato in presenza di sintomatologia clinica. In letteratura sono disponibili poche informazioni riguardo alla sensibilità agli antimicrobici di RA, e riguardano per lo più ceppi isolati da anatidi in paesi extraeuropei (2, 8). Con il presente studio si è voluto indagare l'efficacia *in vitro* di alcuni antimicrobici nei confronti di ceppi clinici di *Riemerella anatipestifer* isolati da broiler e tacchini da carne in Italia.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Lo studio è stato eseguito utilizzando 102 ceppi di RAisolati in Italia tra il 2012 e il 2015 in 28 allevamenti industriali di broiler ed in 70 allevamenti di tacchini da carne. L'isolamento è stato eseguito seminando il campione in terreno non selettivo (agar sangue), incubato in condizioni di microaerofilia (5% CO₂), a 37°C per 24-48 ore. L'identificazione è stata eseguita mediante prove biochimiche e MALDI-TOFMS (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). I ceppi batterici sono stati conservati a -80 °C in Cryo-banks (Nalgene) sino all'esecuzione delle prove di farmacosenibilità.

Determinazione della minima concentrazione inibente

Per la valutazione della sensibilità batterica agli antimicrobici si è fatto ricorso alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) col metodo della microdiluzione in brodo, secondo le procedure descritte nel documento CLSI M07-A10 (3).

Il terreno colturale era il Cation Adjusted Muller Hinton Broth (CAMHB) addizionato col 5% v/v di eritrociti lisati di cavallo. Gli inoculi batterici sono stati allestiti partendo da sospensioni con torbidità pari a 0,5 McFarland. Dopo l'inoculazione le piastre a 96 pozzetti sono state incubate a 35°C per 24- 48h in condizioni di microaerofilia (5-10% CO₂). Il valore di MIC assegnato corrispondeva alla più bassa concentrazione di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile del microrganismo.

Sono stati saggiati i seguenti principi attivi all'interno di diversi range di concentrazione: amoxicillina (0,031– 64 mg/L), ceftiofur (0,015–32 mg/L), enrofloxacin (0,015– 6 mg/L), florfenicolo (0,031–64 mg/L), penicillina G (0,031–4 mg/L), streptomina (0,5– 256 mg/L), tetraciclina (0,125–16 mg/L), tilmicosina (0,062 – 64 mg/L) e trimethoprim/sulfamethoxazolo (0,062/1,187– 32/608 mg/L). Per ciascun farmaco è stata calcolata la MIC in grado di inibire la crescita del 50% (MIC₅₀) e del 90% (MIC₉₀) dei ceppi esaminati.

RISULTATI

I risultati da noi ottenuti non hanno evidenziato differenze di efficacia dei diversi principi attivi considerati nei confronti dei ceppi batterici isolati dal pollo o dal tacchino. In tabella 1 sono riportate la distribuzione delle MIC dei nove antimicrobici, unitamente ai valori di MIC₅₀ e MIC₉₀.

Il ceftiofur ha mostrato la maggiore efficacia *in vitro*, inibendo il 92% dei ceppi di tacchino e l'86% dei ceppi di pollo con una concentrazione di 0,016 mg/L.

Al contrario, la maggior parte dei ceppi testati è risultata inibita da elevate concentrazioni di streptomina e tilmicosina. In particolare, la MIC di quest'ultima molecola è risultata >64 mg/L per l'89% dei ceppi di pollo ed il 99% dei ceppi di tacchino. La distribuzione delle MIC di penicillina e amoxicillinanei confronti dei ceppi isolati dal polloevidenzia la presenza di una esigua sub-popolazione completamente sensibile alle più basse concentrazioni di farmaco. I ceppi che dimostrano la maggiore sensibilità alle più basse concentrazioni di amoxicillina sono gli stessi che presentano la maggiore sensibilità alla penicillina. La distribuzione delle MIC della streptomina presenta un chiaro andamento bimodale e suggerisce

l'esistenza di due sub-popolazioni: una completamente sensibile alla streptomicina, con MIC ≤ 2 mg/L, ed una presumibilmente resistente o intermedia, con MIC >8 mg/L (10).

DISCUSSIONE

Per l'interpretazione della sensibilità di RA agli antimicrobici non sono disponibili breakpoint clinici e ci si deve basare unicamente sulla distribuzione delle MIC.

RA presenta un tropismo per vari organi/tessuti dell'ospite: articolazioni, sierose, occhio, polmone, trachea, ovidutto, SNC. La scelta del farmaco dovrebbe basarsi sulle caratteristiche farmacocinetiche del principio attivo considerato e sulla possibilità che questo raggiunga negli organi target concentrazioni valori maggiori o uguali alla MIC del ceppo isolato. Sebbene gli antibiotici beta-lattamici abbiano evidenziato capacità di inibire la crescita di RA *in vitro* anche a basse concentrazioni, la loro distribuzione nel SNC, in assenza di fenomeni infiammatori, risulta alquanto ridotta. Tali farmaci, invece, potranno risultare efficaci in caso di polisieposite, purché in assenza di localizzazione cerebrale.

Alcuni ricercatori asiatici (2, 9), valutando la sensibilità agli antimicrobici di ceppi di RA isolati da anatre, hanno ottenuto valori di MIC₉₀ di ceftiofur, penicillina, tetraciclina e sulfamidici nettamente superiori a quelli ottenuti nel nostro studio (penicillina: 16 vs 1 mg/L; tetraciclina: 128-256 vs 2 mg/L; ceftiofur: 32 vs 0,032 mg/L; sulfamidici potenziati: 8 vs 0,5 mg/L). Questo risultato potrebbe essere dovuto alla diverse pratiche terapeutiche adottate in Italia rispetto a quelle in uso in Cina e Taiwan, ed in particolare al divieto d'uso del ceftiofur nel pollame, vigente nel nostro paese.

Tabella 1. Distribuzione delle MIC, MIC50 e MIC90 dei principi attivi esaminati, nei confronti di 102 ceppi di *R. anatipestifer* isolati da broiler (B) e tacchino da carne (T). PEN: penicillina; AMX: amoxicillina; ENR: enrofloxacina; FFC: florfenicolo; STR: streptomicina; TET: tetraciclina; TILM: tilmicosina; CEF: ceftiofur; STX: trimethoprim-sulfamethoxazolo.

MIC (mg/L)	0,016	0,032	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	MIC50	MIC ₉₀
Penicillina																	
B	-	3	0	0	10	14	1	0	0	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
T	-	1	0	1	16	54	2	0	0	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5
Amoxicillina																	
B	-	3	0	0	7	15	2	0	0	0	0	1	0	-	-	0,5	1
T	-	1	0	0	9	57	6	1	0	0	0	0	0	-	-	0,5	0,5
Enrofloxacina																	
B	-	0	1	0	2	17	7	1	0	0	0	0	-	-	-	0,5	1
T	-	0	0	0	1	56	17	0	0	0	0	0	-	-	-	0,5	1
Florfenicolo																	
B	-	0	0	0	3	21	2	2	0	0	0	0	0	-	-	0,5	1
T	-	0	0	0	3	39	31	1	0	0	0	0	0	-	-	0,5	1
Streptomicina																	
B	-	-	-	-	-	1	1	3	0	0	3	6	4	10	0	64	128
T	-	-	-	-	-	1	1	2	0	1	1	10	33	23	2	64	128
Tetraciclina																	
B	-	-	-	2	1	3	9	12	1	0	0	-	-	-	-	1	2
T	-	-	-	0	1	3	25	45	0	0	0	-	-	-	-	2	2
Tilmicosina																	
B	-	-	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	25	-	-	64	64
T	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	73	-	-	64	64
Ceftiofur																	
B	24	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	-	-	0,016	0,032
T	68	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0,016	0,016
Sulfamethossazolo +trimeth.																	
B	-	-	1	12	10	3	2	0	0	0	0	0	-	-	-	0,25	0,5
T	-	-	3	16	42	10	1	2	0	0	0	0	-	-	-	0,25	0,5

BIBLIOGRAFIA

1. Bano L., De Zan G., Viel L., Drigo I., Fracas V., Vascellari M., Agnoletti F. (2013). Episodi di meningite da *Riemerella anatipestifer* nel pollo da carne: aspetti clinici e diagnostici. Atti del LII convegno annuale SIPA (Società Italiana Patologia Aviaria), Forlì, 11-12 Aprile 2013.
2. Chang, C.F., W.H. Lin, T.M. Yeh, T.S. Chiang, and Y.F. Chang. (2003). Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and the efficacy of ceftiofur treatment. *J Vet Diagn Invest.* 15:26–29.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; approved standard, tenth ed. CLSI document M07-A10, vol. 35, No. 2., Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
4. Giovanetti. L., Pascucci. S., (1983). Evolution of *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey and fowl. *Clinical Veterinarian (Milan)*, 106 (1983) pp. 42-44.
5. Ruiz JA and Sandhu TS. *Riemerella anatipestifer* Infection. In *disease of Poultry*, 13th edition (2013), David E. Swayne, pag. 823-828.
6. Pascucci, S., Pacchioni. G., Tagliabue. S., Giovanetti. L., (1981). *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey and fowl. *Clinical Veterinarian (Milan)*, 104 (1981), pp. 352–354
7. Pascucci, S., Giovannetti, L. e Massi, P. (1990). Characteristics of *Pasteurella anatipestifer* strains isolated in Italy. *Zootecnica International*, 50-53.
8. Chong Yue Zhong, An Chun Cheng, Ming Shu Wang, De Kang Zhu, Qi Hui Luo, Chuan De Zhong, Ling Li, and ZeDuan. (2009). Antibiotic Susceptibility of *Riemerella anatipestifer* Field Isolates. *Avian Diseases* 53(4):601-607.
9. Na Sun, Jian-Hua Liu, Fan Yang, Da-Chuan Lin, Guang-Hui Li, Zhang-Liu Chen, Zhen-Ling Zeng. (2012). Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks. *Veterinary microbiology*, 3-4, 376-383.
10. EUCAST, 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 503–508.