

## **CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *EIMERIA TENELLA*, *EIMERIA MAXIMA* ED *EIMERIA ACERVULINA* IN POLLI DA CARNE MEDIANTE L'IMPIEGO DI UN'ASSOCIAZIONE TRIMETOPRIM+SULFADIMETOSINA (RAPPORTO 1:5)**

Tosi G.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Parigi M.<sup>1</sup>, Fregnani G.<sup>1</sup>, Benedetti V.<sup>2</sup>, Leotti G.<sup>2</sup>, Ostanello F.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Forlì – Via Don Eugenio Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC)

<sup>2</sup>Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.a. – Via Lorenzini 8, Milano (MI)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna - Via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO)

### **Summary**

A clinical study was conducted to determine the efficacy of an association of trimethoprim and sulfadimethoxine (ratio 1:5) in controlling coccidiosis in broiler chickens. Five groups of 20 broilers (raised in poultry isolators) were orally infected, at 21 days of age, with 1mL of a suspension containing 5000 sporulated oocysts of *Eimeria tenella*, 5000 sporulated oocysts of *Eimeria maxima* and 10000 sporulated oocysts of *Eimeria acervulina*. The treatment (in the drinking water) started at the beginning of the mortality. Different therapeutic schemes were tested: 0.5 mL/L for 5 consecutive days (group “B”); 1 mL/L for the first day followed by 0.5 mL/L over the next 4 days (group “C”); 1 mL/L for 5 consecutive days (group “D”); 2 mL/L for the first day followed by 1 mL/L over the next 4 days (group “E”); infected and not treated group (group “A”). Clinical signs appeared 6 days post-infection and mortality due to coccidiosis beginning 14 days post-infection in all groups and continued in the following two days in the control group only. Mortality and intestinal lesion score were significantly less ( $p < 0.001$ ) in all treated groups compared to the control group. No significant differences in terms of efficacy were noted between group “B” and group “C” and between groups with constant dosage (groups B and D) and groups with variable dosage (groups C and E). The proportion of animals without intestinal lesions (score “0”) showing “moderate” (score 1 and 2) and “severe” lesions (score 3 and 4) was significant different ( $p < 0.001$ ) in the different groups with a greater prevalence of “moderate” and “severe” lesions in the control group.

### **INTRODUZIONE**

La coccidiosi è tuttora considerata tra le patologie economicamente più importanti del settore avicolo. E' causata da protozoi appartenenti al genere *Eimeria*. Nel pollo sono note sette differenti specie appartenenti a questo genere, ognuna delle quali colpisce determinati tratti dell'intestino. Nel pollo da carne le specie di maggiore interesse sono *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella*. Quest'ultima è la più nota e nello stesso tempo la più facile da diagnosticare, anche in campo. *Eimeria tenella* provoca caratteristiche lesioni macroscopiche a livello cecale responsabili di significativi indici di mortalità nei soggetti colpiti, ma non ha effetti evidenti sulle performance produttive. Al contrario, la coccidiosi provocata da *Eimeria acervulina* e da *Eimeria maxima* è in genere responsabile, anche in forma

lieve o addirittura sub-clinica, di peggioramenti degli indici di crescita e degli indici di conversione dell'alimento nei gruppi colpiti. Oltre che su adeguati interventi gestionali, il controllo della coccidiosi si basa sull'impiego alternato di coccidiostatici e di vaccini. In caso di comparsa di episodi clinicamente manifesti di coccidiosi si può ricorrere all'impiego, nell'acqua di bevanda, di farmaci anticoccidici appartenenti a quattro categorie principali: amprolium, toltrazuril, sulfonamidi e sulfonamidi potenziati con diaminopirimidine. L'azione anticoccidica di quest'ultima associazione è nota da molto tempo. Tuttavia sono pochi (e molto datati) gli studi clinici di efficacia di questa combinazione nei confronti della coccidiosi del pollo. Ad esempio, Mathis G.F. et al. (1984) hanno testato l'efficacia dell'associazione trimetoprim/sulfachinossalina (in rapporto 1:3) nei confronti di singole specie appartenenti al genere *Eimeria* cominciando la somministrazione del farmaco il giorno stesso dell'infezione sperimentale. Il presente lavoro riporta parte dei risultati di una prova di efficacia clinica (condotta nel gennaio 2012) di un'associazione trimetoprim+sulfadimetossina (rapporto 1:5) in polli da carne infettati sperimentalmente con un'associazione di *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* ed *Eimeria tenella* e trattati alla comparsa dei segni clinici di coccidiosi e, in particolare, della mortalità provocata dall'infezione sperimentale.

## **MATERIALI E METODI**

### *Animali e condizioni di allevamento*

Sono stati utilizzati 100 polli da carne (ROSS 308 di sesso femminile, 1 giorno di vita) forniti da un incubatoio locale e non vaccinati nei confronti della coccidiosi.

I soggetti sono stati introdotti, in isolatori per specie aviari (Allentown®) dotati di mangiatoie a tramoggia e di abbeveratoi a campana. Alimento (mangime per polli da carne privo di coccidiostatico) e acqua di bevanda sono stati somministrati *ad libitum* per tutta la durata della prova.

### *Protocollo sperimentale*

Gli animali sono stati suddivisi casualmente in 5 gruppi da 20 soggetti ciascuno. All'età di 20 giorni è stato prelevato, da ciascun isolatore, un pool di feci per verificare l'assenza di coccidi.

All'età di 21 giorni tutti i gruppi sono stati infettati per via endo-esofagea con 1 ml/capo di una sospensione contenente le seguenti concentrazioni di oocisti: 5000 oocisti di *E.tenella*, 5000 oocisti di *E.maxima*, 10.000 oocisti di *E.acervulina*.

Le oocisti sono state isolate da casi clinici di coccidiosi osservati in gruppi di polli da carne e di pollastre. Il contenuto intestinale dei soggetti colpiti è stato prelevato e conservato a temperatura di refrigerazione in soluzione al 2% di bicromato di potassio. Per la preparazione dell'inoculo sperimentale il materiale prelevato è stato filtrato su garza e lasciato decantare per una notte aggiungendo del potassio bicromato al 2%. Il giorno seguente è stato eliminato il surnatante, mentre il deposito è stato risospeso in soluzione satura di saccarosio, miscelato e centrifugato (2000 rpm per 10 minuti). Le oocisti sono state in seguito prelevate dalla parte superficiale della sospensione e diluite in acqua distillata. Successivamente, le oocisti sono state fatte sporulare a 30°C per 72 ore mediante insufflazione di aria nella massa del liquido. Infine le oocisti sporulate sono state contate al microscopio ottico mediante l'utilizzo della camera di Mc Master. La concentrazione finale di oocisti sporulate è stata ottenuta attraverso diluizioni in acqua distillata.

Dal giorno seguente l'infezione i gruppi sono stati sottoposti ad esame clinico quotidiano.

#### *Protocollo terapeutico*

La terapia è cominciata il giorno in cui è iniziata la mortalità. Il prodotto utilizzato contiene, per ml, 40 mg di trimetoprim e 200 mg di sulfadimetossina (Prazil N orale ®– Boehringer Ingelheim).

E' stato adottato il seguente protocollo terapeutico:

- Gruppo "A": nessun trattamento (gruppo di controllo).
- Gruppo "B": 0,5 ml/L di acqua di bevanda per 5 giorni consecutivi.
- Gruppo "C": 1 ml/L di acqua di bevanda il primo giorno e 0,5 ml/L di acqua di bevanda per 4 giorni consecutivi.
- Gruppo "D": 1 ml/L di acqua di bevanda per 5 giorni consecutivi.
- Gruppo "E": 2 ml/L di acqua di bevanda il primo giorno e 1 ml/L di acqua di bevanda per 4 giorni consecutivi.

#### *Indagini di laboratorio*

Durante la prova tutti i soggetti deceduti sono stati sottoposti ad esame anatomico-patologico per la valutazione del *lesion score* intestinale secondo lo schema descritto da Johnson et al. (Tabella 1).

Trascorsi 2 giorni dal termine del trattamento i soggetti sopravvissuti sono stati soppressi per dislocazione cervicale e sottoposti ad esame anatomico-patologico per la valutazione del *lesion score* intestinale sempre secondo lo schema descritto da Johnson J. et al.

#### *Analisi statistica*

L'efficacia dei protocolli terapeutici è stata valutata confrontando, per ciascuna specie di *Eimeria*, i valori di *lesion score* nei gruppi trattati (B, C, D, E) rispetto al gruppo di controllo (A). Sono state inoltre considerate le diverse tipologie di somministrazione (dosaggio continuo, B e D o dosaggio con dose di attacco più elevata, C e D). Per i diversi protocolli terapeutici è stata inoltre valutata la proporzione di soggetti senza lesioni (score 0), con lesioni moderate (score 1 o 2) o con lesioni gravi (score 3 o 4) rispetto al gruppo di controllo. Previa valutazione della normalità della distribuzione campionaria, effettuata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov, i confronti sono stati eseguiti utilizzando i test U di Mann-Whitney, l'analisi della varianza non parametrica secondo Kruskal-Wallis o il test chi-quadrato. Le analisi sono state effettuate utilizzando il software IBM-SPSS ver. 23.

## **RISULTATI**

Il trattamento è iniziato a 35 giorni di età ossia 14 giorni post-infezione. I gruppi infettati hanno cominciato a manifestare segni clinici riferibili a coccidiosi dopo 6 giorni dall'infezione. La mortalità è stata osservata il giorno di inizio trattamento in tutti i gruppi infettati ed è proseguita per altri due giorni solo nel gruppo di controllo. Come evidenziato dai valori di *lesion score* l'infezione sperimentale ha consentito di riprodurre efficacemente lesioni macroscopiche riferibili a *E.acervulina* e a *E.tenella*. Meno evidenti, anche nel gruppo di controllo, sono risultate le lesioni del tratto intermedio dell'intestino riferibili a *E.maxima*, nonostante le dosi infettanti fossero

in linea con quanto precedentemente pubblicato. Si può pertanto ipotizzare una ridotta vitalità delle oocisti sporulate di *E.maxima* rispetto alle altre specie impiegate nella prova.

Complessivamente, i gruppi trattati con le diverse posologie hanno presentato valori significativamente inferiori ( $p<0,001$ ) di *lesion score* rispetto al gruppo di controllo (Fig.1 ). Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i trattamenti B e C in termini di riduzione del *lesion score* intestinale, così come non appaiono diversi i risultati tra posologia costante (B e D) o variabile (C e E). La proporzione di animali senza lesioni (score 0), con lesioni moderate (score 1 o 2) o con lesioni gravi (score 3 o 4) è risultata significativamente diversa ( $p<0,001$ ) nei diversi gruppi, con percentuali di soggetti con lesioni moderate o gravi più elevata nel gruppo di controllo (Fig. 2).

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

I risultati della prova hanno evidenziato come l'associazione trimetoprim+sulfadimetossina (rapporto 1:5) si sia dimostrata efficace nel controllo dell'infezione sperimentale sia in termini di riduzione della mortalità sia di gravità delle lesioni intestinali. Una significativa riduzione del *lesion score* intestinale è stata osservata nei confronti di tutte le specie appartenenti al genere *Eimeria* impiegate nell'infezione sperimentale. L'associazione può pertanto essere utile nel controllo delle principali specie appartenenti al genere *Eimeria* responsabili di coccidiosi nel pollo da carne. L'associazione è risultata inoltre essere efficace anche in presenza di infezioni miste. L'efficacia del trattamento è stata evidenziata anche al dosaggio più basso (0,5 ml/L di acqua di bevanda per 5 giorni consecutivi) impiegato nello studio. Occorre tuttavia ricordare che la scelta del dosaggio e del protocollo terapeutico deve essere fatta tenendo in considerazione la situazione clinica e gestionale dell'allevamento. A differenza di altri studi pubblicati in letteratura (in cui l'inizio del trattamento è coinciso con l'infezione sperimentale) il presente lavoro ha rilevato come l'impiego dell'associazione trimetoprim+sulfadimetossina (rapporto 1:5) possa essere efficace nel controllo della coccidiosi anche se iniziato in una fase avanzata dell'infezione (ossia alla comparsa di segni clinici e di mortalità) rispettando in questo modo le attuali linee-guida sull'impiego prudente e ragionato del farmaco veterinario.

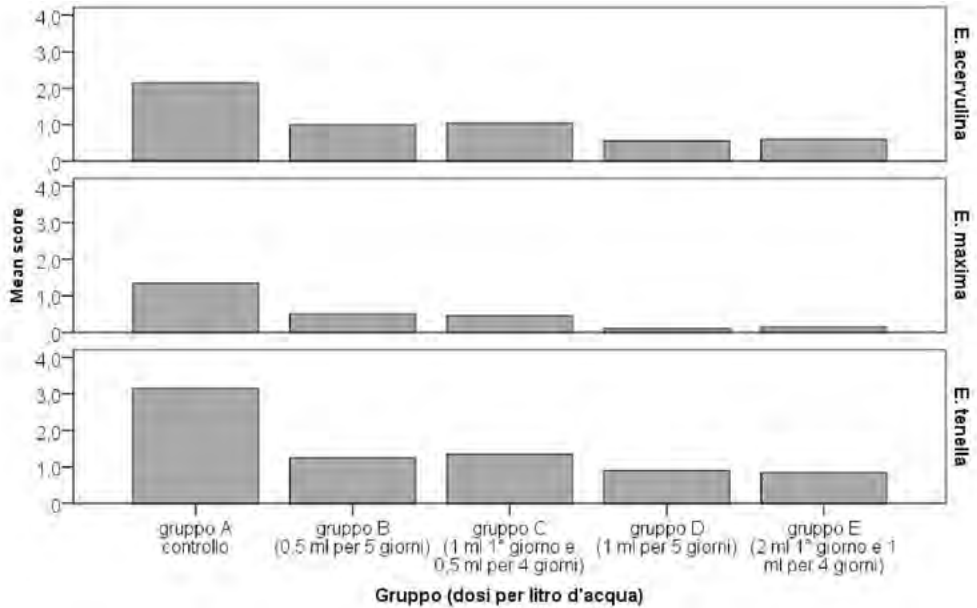
## BIBLIOGRAFIA

1. Eckert J. et al. (1995), guidelines on techniques in coccidiosis research. COST 89/820.
2. Johnson J. et al. (1970), anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental parasitology* 28, 30-36.
3. Mathis G.F., McDougald L.R. (1984), effectiveness of therapeutic anticoccidial drugs against recently isolated coccidia. *Poultry Science* 63, 1149-1153.
4. Mathis G.F. et al. (2004), coccidiosis control by administering toltrazuril in the drinking water for a 2-day period. *Veterinary Parasitology* 121, 1-9.
5. Urquart G.M. (1987), *Veterinary parasitology*. Ed. Longman Scientific and Technical. First published 1987, Essex CM202JE, England, p.270.
6. White G, Williams R.B. (1983), evaluation of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline for the treatment of bacterial and coccidial diseases of poultry. *The Veterinary Record* 24/31, 608-612.

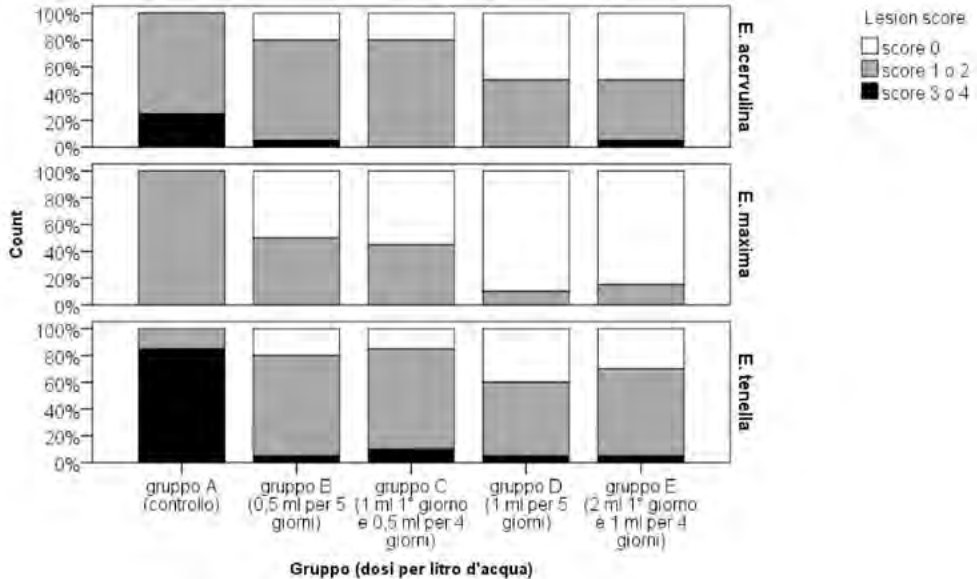
**Tabella 1:** *Lesion score* intestinale come descritto da Johnson J. et al. (1970)

SPECIE	Punteggio				
	“0”	“1”	“2”	“3”	“4”
<i>E.acervulina</i>	Assenza di lesioni	Piccole lesioni biancastre osservabili sulla mucosa del duodeno	Lesioni più frequenti ed estese ma non coalescenti	Lesioni coalescenti, ispessimento della parete e contenuto acquoso del duodeno	Mucosa del duodeno grigiasta e congesta, notevole ispessimento della parete, presenza di essudato biancastro di consistenza cremosa
<i>E.maxima</i>	Assenza di lesioni	Petecchie emorragiche osservabili sulla sierosa del tratto intermedio dell'intestino	Numerose petecchie emorragiche sulla sierosa, contenuto mucoso di colore arancio del tratto intermedio dell'intestino	Oltre alle lesioni del punto precedente il tratto intermedio dell'intestino si presenta dilatato e la parete intestinale appare ispessita.	Oltre alle lesioni del punto precedente si osserva un contenuto necrotico-emorragico del tratto intermedio dell'intestino
<i>E.tenella</i>	Assenza di lesioni	Petecchie emorragiche sulla parete dei ciechi, contenuto cecale normale	Numerose petecchie emorragiche, presenza di tracce di sangue nel contenuto cecale	Abbondante presenza di sangue nei ciechi, assenza di materiale fecale, ispessimento della parete dei ciechi	Ciechi dilatati con contenuto emorragico-caseoso

NOTA: il punteggio “4” viene attribuito ai soggetti deceduti per coccidiosi.



**Figura 1.** Valore medio del *lesion score* intestinale per specie di *Eimeria* e protocollo terapeutico



**Figura 2.** Percentuale di soggetti senza lesioni (score 0), con lesioni moderate (score 1 o 2) o con lesioni gravi (score 3 o 4) per specie di *Eimeria* e protocollo terapeutico