



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Incontro di aggiornamento
Gruppo Veterinario Suinicolo (GVS)
Mantova 5/4/2024



Le infezioni batteriche del suino:

aggiornamenti sulla diagnosi di laboratorio e
interpretazione del dato MIC nell'antibiogramma

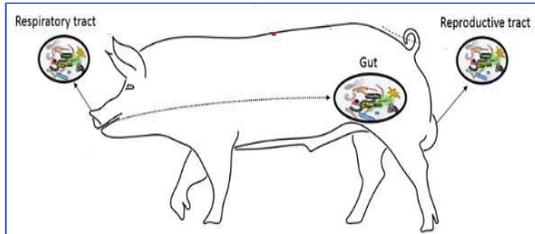
Dr. Carlo Rosignoli I.Z.S.L.E.R. – Sede territoriale di Mantova



I batteri e il suino

Batteri «cattivi»

- Patogeni
 - Primari
 - Secondari/Opportunisti
- Patogeni per l'uomo (suino come serbatoio)



Batteri «buoni»

- Microbiota (flora app. digerente, respiratorio, riproduttivo ...)

- Colonizzazione
- Moltiplicazione
- Azione patogena
 - Invasività
 - Produzione di tossine

- Metabolismo digestivo
- Produzione di vitamine
- **Contrasto ai patogeni**
- **Regolazione del sistema immunitario**
- Produzione di neurotrasmettitori
- ...



Batteri patogeni più frequenti e ... quello che si fa in laboratorio nella routine diagnostica



	<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
<i>Streptococcus suis</i>	si	si	si	no	si	no	si
<i>Salmonella enterica</i>	si	si	no	no	si	si	si
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	si	no	si	no	no	si	no
<i>Escherichia coli</i>	si	si	no	no	si	no	si
<i>Glass. parasuis e Mycopl. hyorhinis</i>	si	si (G. parasuis)	si	no	no	no	si (G. parasuis)
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	si	si	si	no	no	no	no
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	si	si	no	no	si	si	no
<i>Clostridium difficile e C. perfringens</i>	si	si	si	si (C. perf. Ufc/g)	si	no	si
<i>Lawsonia intracellularis</i>	si	no	si	si (qPCR)	no	si	no
<i>Staphylococcus hyicus</i>	si	si	no	no	no	no	si
<i>Trueperella pyogenes</i>	si	si	no	no	no	no	no



Streptococcus suis

- Al primo posto tra le richieste in batteriologia
- Vaccino stabulogeno buoni risultati
- Attenzione ad altri streptococchi «emergenti»

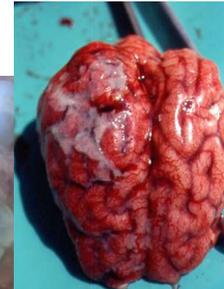


Streptococcus suis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	no	si	no	si



Quadro generale di una infezione acuta da Str. suis in un suinetto svezzato.



Meningite suinetto
in svezzamento



Artrite in un suinetto
sottoscrofa



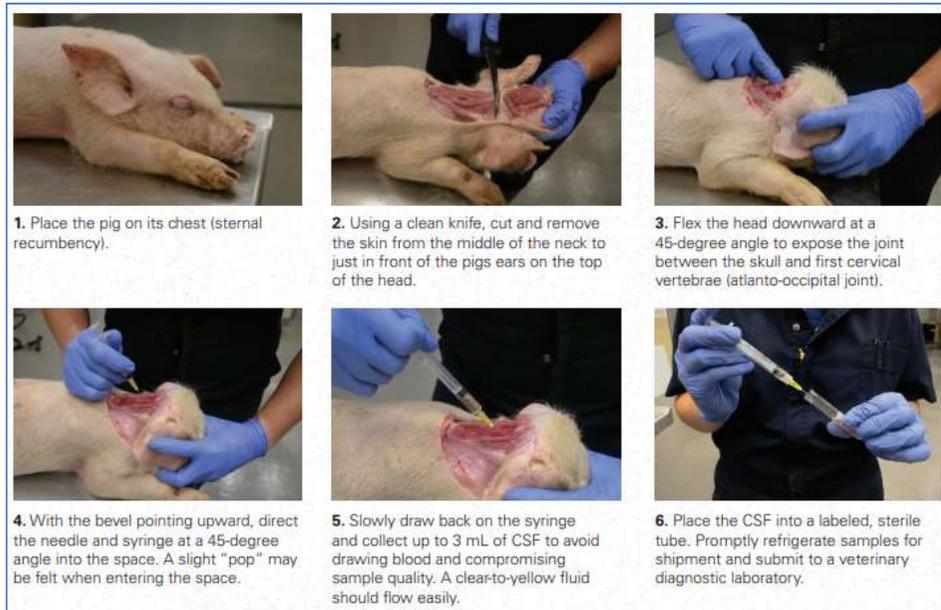
Endocardite **cronica** in un
suino all'ingrasso

- Infezione endemica nel suino - zoonosi
- Colonizza il primo tratto respiratorio
- Fattori di rischio → Abbassamento delle difese e/o aumento dell'esposizione → batteriemia con localizzazioni secondarie multiple (**ceppi invasivi**)
 - Vari organi
 - Sierose
 - Valvole cardiache (biofilm)



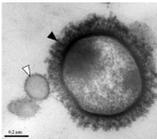
Streptococcus suis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	no	si	no	si

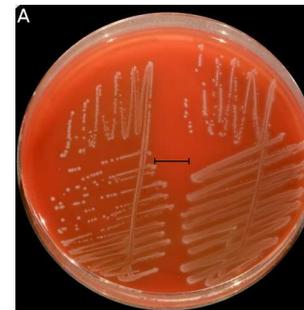


Prelievo LCR (VDL – Iowa State Univ.)

- **Campionamento:** tampone meningeo (foramen magnum), liquido cefalorachidiano (cisterna magna), liquido articolare (fondi ciechi capsula articolare) ...
- Cocco Gram positivo dotato di capsula polisaccaridica (contrasta l'attività dei fagociti)
- Cresce velocemente in coltura (18-24 h)



Haas and Greiner (2018)



Strep suis coltura su agar globuli (vetbac.org)



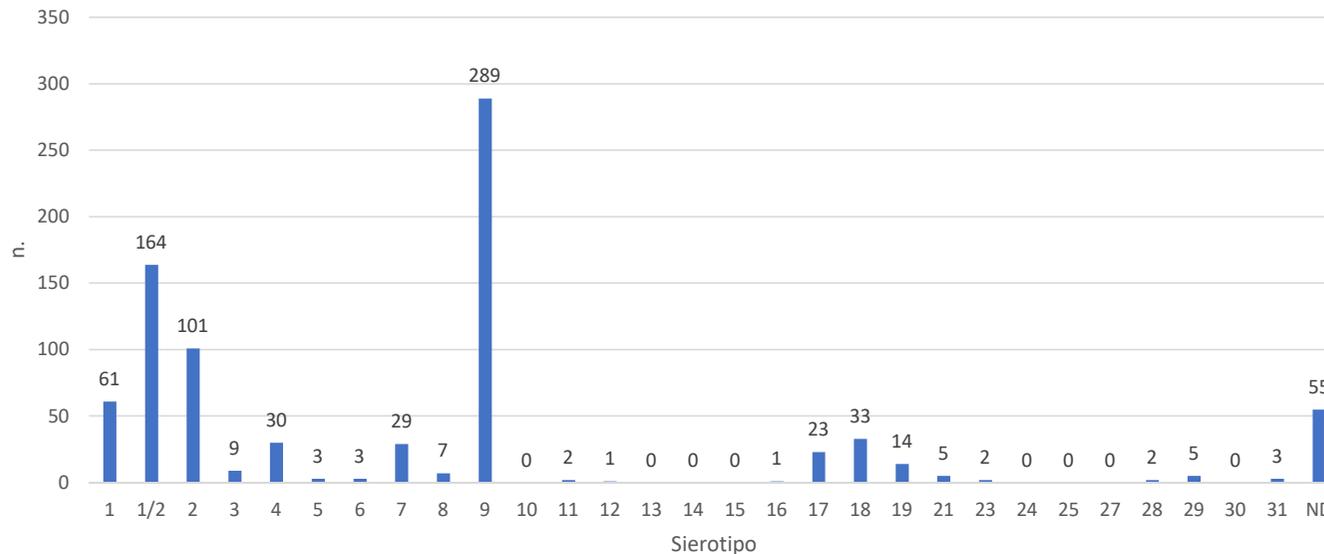
Gene *gdh* rilevato con metodica PCR



Streptococcus suis

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	si	no	si	no	si

Strep. suis: sierotipi IZSLER-Mantova n. 842 ceppi (2019-2023)



- PCR multiplex (4 steps) → **29 genotipi capsulari** (*cps1* – *cps2* ecc.)
- Importanza della genotipizzazione:
 - Diverso corredo antigenico tra i vari geno-sierotipi capsulari
 - Scelta dei ceppi da inserire nel vaccino stabulogeno
- Possibile classificazione anche sulla base dei «sequence types» (ST) → «clonal complex» (CC)
- Numerosi fattori di virulenza



Streptococcus suis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	no	si	no	si



- Batterine da ceppi predominanti in allevamento, adjuvate con montanide
- Fase 1: individuazione dei sierotipi circolanti nell'allevamento e selezione dei ceppi invasivi da inserire nel vaccino
- Fase 2: produzione delle dosi vaccinali richieste con ricetta elettronica (2 mesi)
- Fase 3: protocollo immunizzante nelle scrofe «prime e boost» (6-3 settimane prima del parto)
- Fase 4: monitoraggio sui nuovi casi che si presentano dopo immunizzazione delle scrofe

IZSLER sede di Mantova - anno 2023
80.000 dosi di vaccino



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Altri streptococchi «emergenti»...

Streptococcus equi subs. *zooepidemicus*
Streptococcus dysgalactiae



Streptococcus equi sub. zooepidemicus



Geiping, L., Detlefsen, H., Trittmacher, S. et al. Streptococcus equi subspecies zooepidemicus – a case report of sudden death in a German sow farm. Porc Health Manag 9, 48 (2023).

- In passato epidemie gravi nel suino in Cina
- Dal 2019 in USA e in Canada (ceppo epidemico **ST-194**) → **patogeno emergente**
 - Focolai con aborti e setticemie nelle scrofe e scrofette (morte improvvisa). Episodi con 25-30% letalità
- Più recentemente nei Paesi Bassi e in Germania (2023) ... ceppo non ST-194
 - Scrofe in gestazione: apatia, febbre, disappetenza e in diversi casi morte (polisierosite)

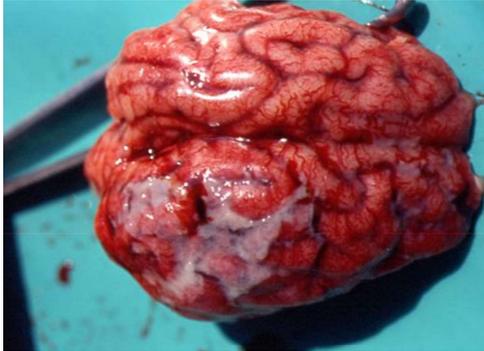


Marcelo Gottschalk, DVM, PhD, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal

Autogenous vaccines do not seem to prevent infection and disease nor lead to passive immunity transfer. Outbreak control relies solely on prolonged treatment with antimicrobials. Because resistance emerges rapidly during outbreaks, depopulation has sometimes been required to eliminate *S zooepidemicus* from affected herds.



Streptococcus dysgalactiae



- Isolato da campioni con lesioni sospette di streptococcosi
- Prevalentemente da artriti e meningiti (ceppi invasivi)
- In letteratura anche in casi di endocardite



- Per ora solo casi sporadici
- Necessario mantenere una sorveglianza del fenomeno



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Salmonella enterica subs. enterica

Due forme cliniche → serovars *S. Typhimurium* (ST) e *S. Choleraesuis* (SC)

Zoonosi ... con segnalazione

Ceppi MDR



Salmonella enterica

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	si

- Infezioni endemiche nei suini
- **Due forme cliniche**

Serovar ad ampio spettro d'ospite

**S. Typhimurium - enterocolite
fibrinoso-necrotica (sub-
acuta, cronica)**



**S. Choleraesuis:
setticemia (iperacuta)**

Serovar ospite-adattata al suino



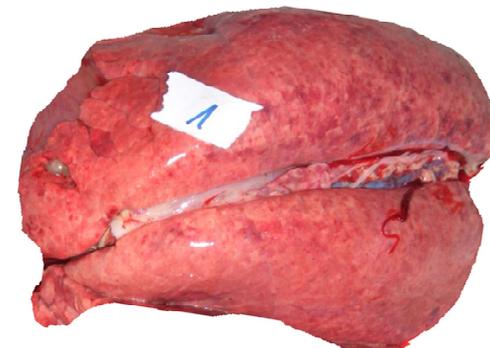
Cianosi cutanea



Splenomegalia



Linfoadenomegalia



Congestione polmonare



Salmonella enterica

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	si	si



• Isolamento – 2 metodi:

A. Coltura diretta

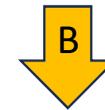
- 1) forme cliniche (ST e SC)

B. Coltura con pre-arricchimento (ST):

- 1) Su feci, linfonodi ... per individuare i «portatori»
- 2) Su campioni ambientali in allevamento per monitorare la diffusione del patogeno nei vari reparti



Esame batteriologico
«diretto»



Esame batteriologico con
pre-arricchimento



Salmonella enterica

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	si



Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen	
		Phase 1	Phase 2

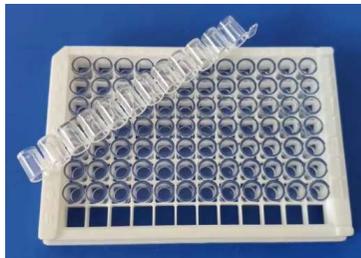
Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2
Choleraesuis ¹	6,7	c	1,5

- Tipizzazione sierologica
- Più di 2000 sierotipi (serovars)
- Classificazione di **Kauffmann-White** basata sugli antigeni O (somatici) e H (flagellari): sieroaagglutinazione
- Lab. batteriologia specializzata (Brescia)
- **Segnalazione all'AC** quando è disponibile il dato di tipizzazione (zoonosi)



Salmonella enterica

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	si	si



- ELISA indiretta (Idexx)
- Esito +/-
- **Anticorpi verso antigeni comuni** ai vari serovars
- Positività al test dopo 10 giorni dall'infezione sperimentale (cut-off 10% OD)
- **In Danimarca** e in altri paesi europei test utilizzato nel piano di eradicazione/controllo su campioni di siero o **meat juice** di suini al macello
- Applicazione in campo:
 - Diagnosi (doppio prelievo → sieroconversione)
 - Monitoraggio → andamento prevalenza dell'infezione nel tempo (dopo applicazione di un piano di controllo)



Salmonella enterica

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	si



Vaccino stabulogeno contro la Salmonella nel suino

Composizione

Colture inattivate di *Salmonella cholerae suis*, o *Salmonella typhimurium* (6,3ml/ml).
Adjuvante: idrossido di alluminio.

Indicazioni

Specie trattabili: suino.

Profilassi delle infezioni da *Salmonella cholerae suis* o *Salmonella typhimurium*

Il prodotto inoculato per via sottocutanea produce uno stato di reazione immunitaria in grado di determinare lo sviluppo di immunità anticorpale e cellulo-mediata verso salmonella del suino riducendo le possibilità di infezione e la sintomatologia clinica in caso di infezione.

Modalità d'uso

Via di somministrazione: inoculare per via sottocutanea o intramuscolare nella fossetta retroauricolare.

Posologia: 3 ml (1 dose)/capo.

Schema vaccinale: due interventi distanziati di 2-3 settimane:

Consumare il contenuto del flacone entro 15 giorni dall'apertura.

Conservare a 4 ± 3 °C. Dopo l'uso trattare come rifiuto speciale, legge 915/82.

Tempi di attesa

0 giorni.

Confezioni

Flaconi da 50 dosi (ml 150).

- Vaccino stabulogeno per *S. Choleraesuis*
- Unica possibilità di «controllo» della patologia in caso di ceppi multiresistenti (MDR)
- Batterine adjuvate in idrossido di alluminio
- Possibilità di vaccinare scrofe e/o suinetti
- **Protocollo consigliato:** priming nei suinetti a partire da 15 gg di età (... se le scrofe non sono vaccinate) e richiamo dopo 3 settimane.
- **Sede di Mantova- anno 2023: richieste per 200.000 dosi**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Mycoplasma hyopneumoniae

«Door opener» per altre infezioni respiratorie

Importante il monitoraggio al macello



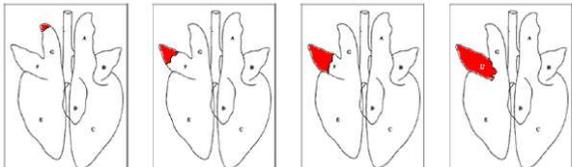
Mycoplasma hyopneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	no	si	no	no	si	no



- **Polmonite enzootica**: infezione ad evoluzione cronica progressiva (distruzione dell'epitelio ciliato e infiltrazione linfocitaria peribronchiale ... «cuffing pneumonia»)
- Lesioni in **sede necroscopica** nei suini in accrescimento inviati in IZS per altre patologie letali
- **Monitoraggio delle lesioni al macello con la griglia Madec/Dottori**
 - Valutazione dello stato sanitario specifico di un allevamento
 - Valutazione dell'efficacia degli interventi mirati al controllo dell'infezione in allevamento
 - Comparazione dei lotti esaminati in una determinata area geografica (classificazione in quartili).

Lobe Score	EP lesion extension
0	Absence of EP lesions
1	From 0% to 25%
2	From 26% to 50%
3	From 51% to 75%
4	> 75%





Mycoplasma hyopneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	no	si	no	no	si	no



- Patogeno molto difficile da coltivare
- Real Time PCR direttamente su tessuto polmonare o su **tampone laringeo** nell'animale in vita
- MP 09/220: ricerca del gene codificante la proteina P102

 **Veterinary Microbiology**
Volume 203, May 2017, Pages 103-109

Comparison of sample types and diagnostic methods for *in vivo* detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection

Maria Pieters^a, Jason Daniels^{a, b}, Albert Rovira^a

- Non è routinaria la ricerca di *M. hyopneumoniae*
- Il test viene effettuato solo su espressa richiesta.



Mycoplasma hyopneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	no	si	no	no	si	no



- MP 04/095
- **ELISA indiretta** (ID vet)
- Applicazione in campo:
 - Diagnosi / Monitoraggio
- Limiti del test:
 - risente della lenta diffusione dell'infezione e della conseguente **lenta risposta immunitaria**
 - **non permette la differenziazione** tra soggetti vaccinati e infetti



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Escherichia coli

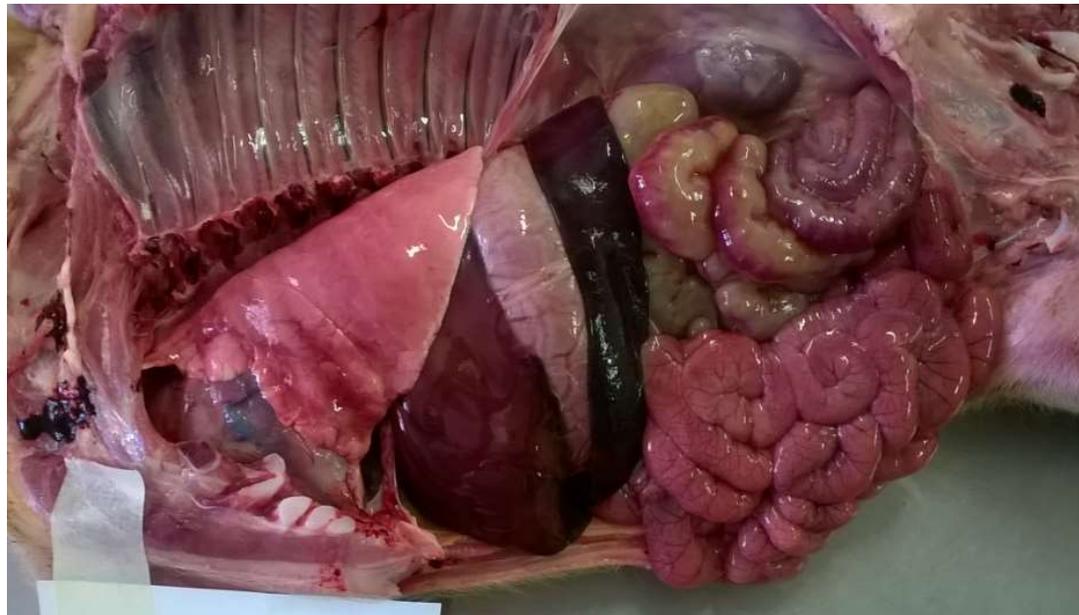
Il problema batterico n.1 dopo il bando dello zinco e le limitazioni per la colistina

Ceppi MDR



Escherichia coli: ceppi enterotossici

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	no	si



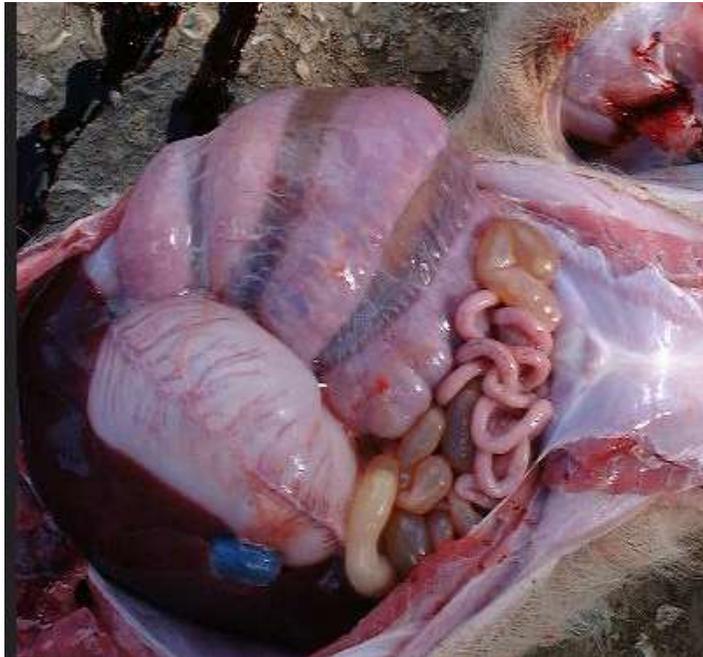
Suinetto svezzato con enterite da E. coli

- Enterite neonatale (sottoscrofa)
 - Deficit immunità materna
 - Ceppi altamente patogeni
- Enterite post-svezzamento
 - Svezzamento precoce
 - Cambio di alimentazione
 - Cambio di ambiente
 - Riduzione dei Lactobacilli (DISBIOSI) aumento del pH intestinale
- Anse intestinali dilatate, meteoriche, edematose e iperemiche (digiuno medio e distale)
- Diagnosi: isolamento di E.coli a cui segue l'identificazione dei fattori di virulenza ETEC



Escherichia coli: malattia degli edemi

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	no	si



- Malattia degli edemi
 - Mesocolon
 - Parete dello stomaco
 - Sottocute del cranio e palpebre
- Enterotossitemia iperacuta
- E. coli F18 + Stx2e (verotossina –aumento permeabilità vascolare) → **ceppi EDEC**



Escherichia coli

<i>Lesioni anat. pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	no	si



E. coli emolitico

- In caso di forma enterica specifica prevalgono gli E. coli patogeni sugli E. coli commensali
- E. coli patogeni possono essere emolitici e non emolitici



Escherichia coli

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	no	si

ETEC and EDEC virotypes

Adesine	Tossine	Malattia
F4-F5-F6-F41	STa-STb-LT	Diarrea neonatale
F4-F18	STa-STb-LT	Diarrea post-svezzamento
F18	Stx2e	Malattia degli edemi

- **PCR multiplex** per i fattori di patogenicità dei ceppi di E. coli enterotossici (ETEC) e della malattia degli edemi (EDEC)
- **F5-F6-F41**: la suscettibilità a queste adesine decresce con l'età dei suinetti per la riduzione progressiva del numero di recettori specifici
- **F4 e F18** sono le adesine più comuni nella diarrea post-svezzamento
- Recettori per **F18** presenti solo dopo lo svezzamento



Escherichia coli

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	no	si

Vaccino stabulogeno contro la COLIBACILLOSI neonatale del SUINO

Composizione

Culture inattivate di Escherichia coli (10 mld/ml). Adjuvante: idrossido di alluminio.

Indicazioni

Specie trattabili: suino.

Profilassi delle Colibacillosi neonatali dei suinetti mediante vaccinazione di scrofe e scrofette gestanti.

Modalità d'uso

Via di somministrazione: inoculare per via sottocutanea o intramuscolare nella fossetta retroauricolare.

Posologia: 3 ml (1 dose)/capo. Schema vaccinale suggerito: due interventi distanziati di 2-3 settimane: primo intervento 6 settimane prima del parto; secondo intervento dopo 2-3 settimane dal primo. Ripetere 2-3 settimane prima di ogni parto.

Conservare a 4 ± 3 °C. Dopo l'uso trattare come rifiuto speciale, legge 915/82.

Tempi di attesa

0 giorni.

Confezioni

Flaconi da 50 dosi (ml 150).

- Produzione dell'autovaccino solo quando:
 - In caso di forme **enteriche neonatali** se i vaccini commerciali non hanno dato esito positivo
 - In caso di forme **setticemiche neonatali** per la presenza di particolari ceppi «invasivi»



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Glasserella parasuis e Mycoplasma hyorhinis

Le polisierositi «classiche»



Glasserella parasuis e Mycoplasma hyorhinis

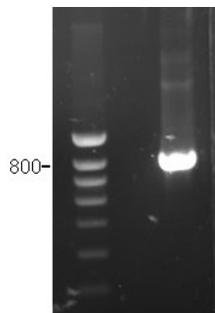
Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si (G. parasuis)	si	no	no	no	si (G. parasuis)





Glasserella parasuis

Lesioni anat.pat	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si (G. parasuis)	si	no	no	no	si (G. parasuis)



- Colonizza le prime vie respiratorie (endemico)
 - Patogeno di irruzione secondaria/opportunista
 - Bacillo Gram negativo – microaerofilo – NAD dipendente
 - Più di 20 sierotipi (altamente patogeni 1 e 5)
 - Bassa cross-protezione tra i diversi sierotipi
 - **Difficile l'isolamento su terreni di coltura**
 - **In particolare da soggetti trattati con antibiotico**
- ↓
- PCR su tessuti e liquidi patologici



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Glasserella parasuis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si (G. parasuis)	si	no	no	no	si (G. parasuis)



- Solo se i vaccini in commercio non danno risultati

Vaccino stabulogeno emulsionato contro la POLISIEROSITE dei SUINI (MALATTIA DI GLÄSSER) -Scrofe-

Composizione

Culture inattivate di Haemophilus parasuis (15 mld/ml). Adjuvante: oli minerali.

Indicazioni

Specie trattabili: suino. Profilassi vaccinale della Polisierosite dei suini (Malattia di Glässer) attraverso la vaccinazione delle scrofe.

Modalità d'uso

Via di somministrazione: inoculare per via intramuscolare nella fossetta retro-auricolare.

Posologia: 2 ml (1 dose)/capo. Schema vaccinale suggerito:

SCROFE: immunità di base, due interventi vaccinali a distanza di 3-4 settimane. Richiamo 4-5 settimane prima del parto.

Conservare a 4 ± 3 °C. Dopo l'uso trattare come rifiuto speciale, legge 915/82.

Tempi di attesa

0 giorni.

Confezioni

Flaconi da 100 dosi (ml 200).

Regime di dispensazione

Ricetta Medico-Veterinaria in semplice copia non ripetibile.

Vaccino stabulogeno contro la POLISIEROSITE dei SUINI (MALATTIA DI GLÄSSER) -suinetti-

Composizione

Culture inattivate di Haemophilus parasuis (10 mld/ml).

Adjuvante: idrossido di alluminio.

Indicazioni

Specie trattabili: suino.

Profilassi vaccinale della Polisierosite dei suini (Malattia di Glässer).

Modalità d'uso

Via di somministrazione: inoculare per via intramuscolare nella fossetta retro-auricolare. Posologia: 2 ml (1 dose)/capo. Schema vaccinale suggerito: SUINETTI: primo intervento vaccinale a 3 settimane di vita, richiamo dopo 3-4 settimane.

Conservare a 4 ± 3 °C. Dopo l'uso trattare come rifiuto speciale, legge 915/82.

Tempi di attesa

0 giorni.

Confezioni

Flaconi da 100 dosi (ml 200).

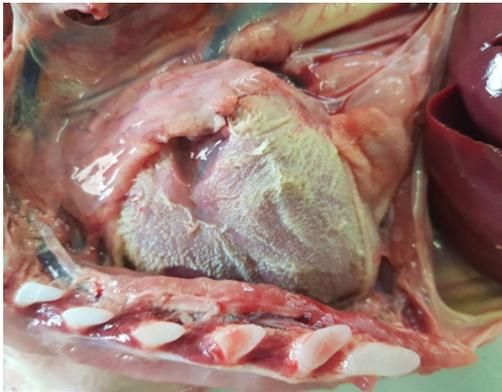
Regime di dispensazione

Ricetta Medico-Veterinaria in semplice copia non ripetibile.



Mycoplasma hyorhinis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si (G. parasuis)	si	no	no	no	si (G. parasuis)



- PCR per rilevare la presenza direttamente da campioni prelevati dalle lesioni (**pericarditi, artriti, pleuriti sierofibrinose**)
- I suinetti si infettano dalla scrofa e poi manifestano la patologia e lesioni prevalentemente nell'immediato post-svezzamento
- Controllo → trattamento della scrofa prima del parto con una molecola antibiotica attiva nei confronti dei micoplasmi
- Vaccino: sperimentazioni in letteratura





Mycoplasma hyorhinis: vaccino inattivato

> [Vaccine](#). 2018 Jan 8;36(3):408-412. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.063. Epub 2017 Dec 6.

Efficacy of an inactivated *Mycoplasma hyorhinis* vaccine in pigs

Brian Martinson ¹, Whitney Zoghby ², Kenneth Barrett ², Lawrence Bryson ², Rodney Christmas ²,
F C Minion ³, Jeremy Kroll ²



USA

Vaccinazione dei suinetti sottoscrofa (3 sett.)
Secondo gli Autori → riduzione significativa
della patologia negli svezzati



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Brachyspira hyodysenteriae

Nessun vaccino disponibile

Resistenza agli antimicrobici crescente

Non resta altro che l'eradicazione



Brachyspira hyodysenteriae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	no	no	no	no



Colon con infezione da B. hyodysenteriae



Aspetto della mucosa del colon

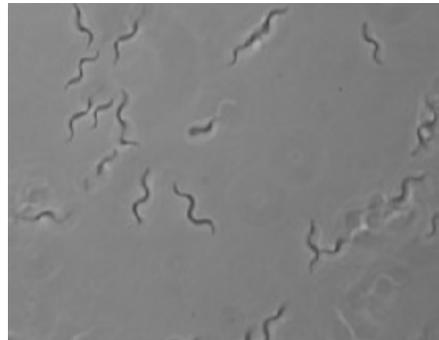
- Dissenteria suina – Enterite necrotica (**colite muco-emorragica**)
- **Possibile l'eradicazione** con depopolazione parziale e medicazione strategica – pre-requisiti:
 - Sito 1 – Sito 2 – Sito 3
 - Alto livello di biosicurezza
 - **Derattizzazione (ospiti)**
 - Antibiotici efficaci per risanare le scrofe
 - Possibilità di vuotare le vasche liquami
 - Disinfettanti efficaci per risanare l'ambiente
 - **Test per monitorare nel tempo la negatività e i riproduttori dichiarati «free» in entrata**





Brachyspira hyodysenteriae

Lesioni anat.pst.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	no	no	no	no



Brachyspira hyodysenteriae



Coltura di Brachyspira hyodysenteriae

- In laboratorio crescita lenta (**5 giorni**) su terreno solido specifico parzialmente selettivo
- Identificazione di specie mediante **test PCR**
- Ceppi fortemente Beta-emolitici
 - **B. hyodysenteriae**
 - **B. hampsonii (NO)**
 - **B. suanatina (NO)**

} Non rilevati dal test attualmente in uso in IZSLER
- Ceppi debolmente emolitici
 - **B. pilosicoli** (spirochetosi intestinale)
 - **B. murdochii**
 - **B. innocens**
 - **B. intermedia**



Brachyspira hyodysenteriae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	no	no	no	no

- Possibilità di eseguire l'antibiogramma con MIC (VetMIC-Brachy, SVA) micro-diluizione in brodo
 - Tempo necessario: circa **3 settimane** (in alcuni casi non si riesce a sub-coltivare il ceppo isolato)

Esempio di esito su RDP

Prova: MIC kit Brachy Tecnica:		Metodo di Prova: MP 01/205 rev. 1 - 2016				
Agente Etiologico: Brachyspira hyodysenteriae						
Campione n°: 1						
Minima concentrazione inibente	Doxiciclina = 0,25 µg/mL	Lincomicina = 32 µg/mL	Tiamulina = 1 µg/mL	Tilosina = 64 µg/mL	Tilvalosina = 2 µg/mL	Valnemulina = 0,5 µg/mL

• Antibiotici inseriti nel test:

- Tiamulina
- Valnemulina
- Doxiciclina
- Tilvalosina
- Lincomicina
- Tilosina

} Criteri interpretativi dei
valori di MIC per B.
hyodysenteriae e B.
pilosicoli





Criteri interpretativi MIC Brachyspira

David J. Hampson a b, Kittitat Lugsomya a, Tom La b, Nyree Dale Phillips b, Darren J. Trott c 1, Sam Abraham b 1 Antimicrobial resistance in *Brachyspira* – An increasing problem for disease control *Veterinary Microbiology* Volume 229, February 2019, Pages 59-71



Some proposed breakpoints for interpretation of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) with six commonly used antimicrobials for *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*.

	Method for AST ^a	Breakpoint	Carbadox	Lincomycin	Tylvalosin	Tylosin	Tiamulin	Valnemulin	Publication
<i>B. hyodysenteriae</i>	AD	Clinical	-	> 36	-	> 4	> 4	-	Rønne and Szancer, 1990
	BD	Clinical	-	> 50-100	> 16-32	> 16-32	> 0.5-1	> 0.125-0.25	Burch, 2005
	AD	Clinical	-	-	-	-	≥ 1	-	Vyt and Hommez, 2006
	BD*	ECOFF	-	> 1	> 1	> 16	> 0.25	> 0.125	Pringle et al., 2012
	BD*	Clinical	-	-	-	> 16	> 2	-	SVARM, 2014
<i>B. pilosicoli</i>	AD	Clinical	≥ 1	≥ 75	-	-	≥ 2	-	Duhamel et al., 1998
	BD*	Clinical	-	-	-	> 16	> 2	-	SVARM, 2014

^bECOFF, epidemiological (wild type) cutoff; 'Clinical', indicates resistance breakpoint.

^a AST: antimicrobial susceptibility testing. ADS, agar dilution. BD, broth dilution. Testing with commercial VetMIC Brachy marked with an asterisk*.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Actinobacillus pleuropneumoniae

Patogeno primario

Importante il monitoraggio al macello

Possibile eradicazione



Actinobacillus pleuropneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no



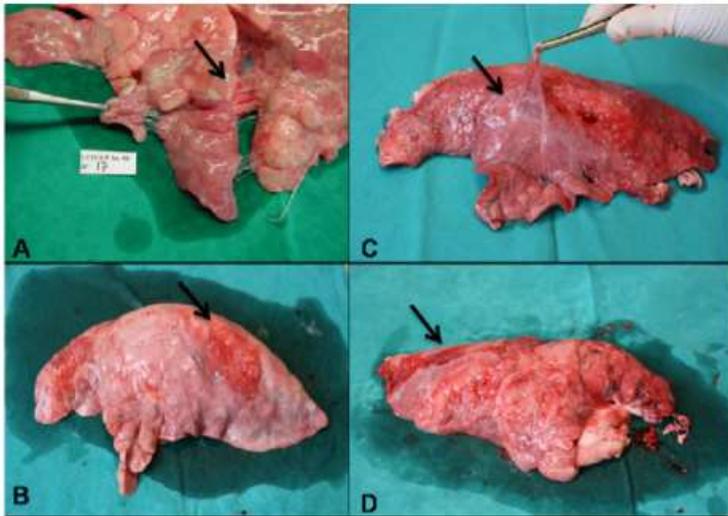
- Due forme patologiche
 - **Polmonite emorragica necrotizzante** associata a pleurite fibrinosa acuta (vari livelli di gravità)
 - **Pleurite fibrinosa cronica** come esito di focolai polmonari parzialmente «guariti» (**minori performance di crescita** → lesioni al macello)
- Le lesioni macroscopiche sono **patognomoniche !!!**





Griglia SPES: slaughterhouse pleurisy evaluation system

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no



Punteggio	Caratterizzazione delle lesioni
0	Assenza di lesioni
1	Lesione <u>ventro-craniale</u> : aderenza pleurica tra i lobi o sul bordo ventrale dei lobi
2	Lesione focale monolaterale dorso- caudale
3	Lesione bilaterale di tipo 2 o lesione monolaterale estesa (almeno 1/3 di un lobo diaframmatico)
4	Lesione bilaterale gravemente estesa (almeno 1/3 di entrambi i lobi diaframmatici)

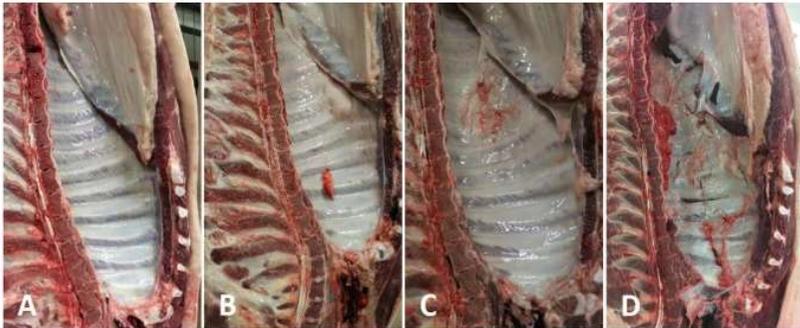
- Monitoraggio al macello delle lesioni da APP
- **Indice APPI**: parametro fornito dalla griglia SPES e che considera specificamente la **pleurite dorso-caudale**, è strettamente correlato alla presenza e alla gravità della pleuropolmonite suina nell'allevamento di origine

Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors G. Merialdi a , M. Dottori a , P. Bonilauri a , A. Luppi a,† , S. Gozio b , P. Pozzi b , B. Spaggiari a , P. Martelli c - Veterinary Journal 2012

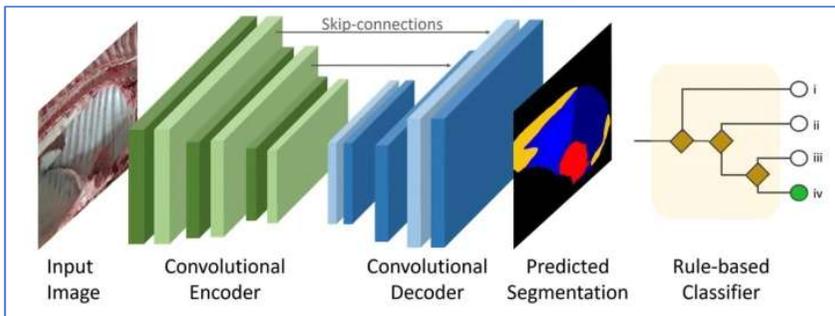


PEPP: pleurisy evaluation of the parietal pleura

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no



Punteggio della pleurite secondo il metodo PEPP semplificato. **A** Nelle mezzene sane, la pleura parietale appare liscia, umida e trasparente, essendo facilmente apprezzabili gli spazi intercostali. **B** Un piccolo frammento di polmone aderisce alla pleura parietale, a livello del 4° spazio intercostale (punteggio = 1 punto). **C** La pleurite colpisce gli spazi intercostali caudali; a questo livello la pleura parietale appare da grigiastria a rossastra e ruvida (punteggio = 2 punti). L'intera pleura parietale è interessata da pleurite, frammenti polmonari aderenti alla parete toracica (punteggio = 3 punti).



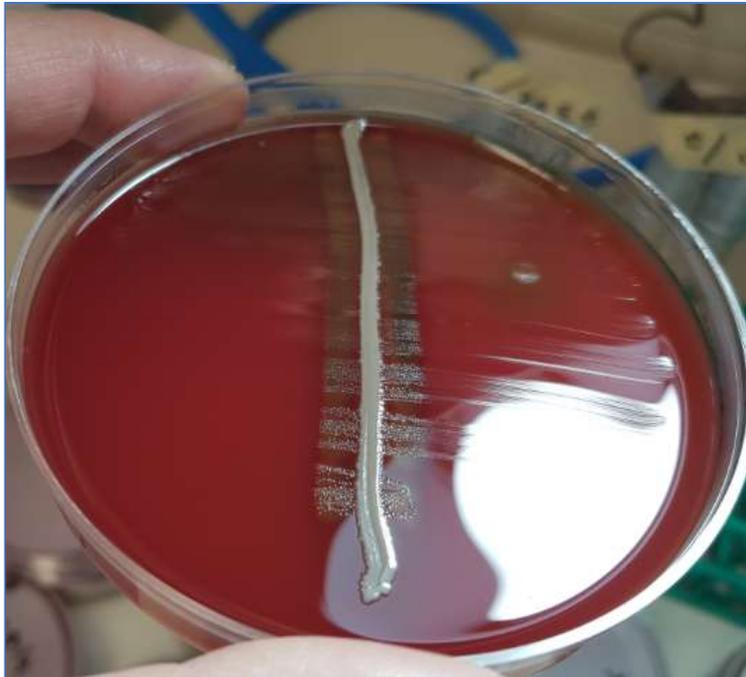
Trachtman, A.R., Bergamini, L., Palazzi, A. *et al.* Scoring pleurisy in slaughtered pigs using convolutional neural networks. *Vet Res* 51, 51 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s13567-020-00775-z>

- Applicazione di sistemi di **intelligenza artificiale (AI)** e **deep learning (DL)**
 - L'intelligenza artificiale (AI) è una disciplina che mira a sviluppare macchine in grado di percepire l'ambiente e agire per massimizzare il proprio successo rispetto a un obiettivo definito
 - Deep learning (DL) è un sottoinsieme dell'apprendimento automatico e si basa su reti di processori informatici altamente interconnessi, in grado di eseguire calcoli paralleli per l'elaborazione dei dati e la rappresentazione della conoscenza



Actinobacillus pleuropneumoniae

<i>Lesioni anat. prt.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	si	si	no



- Patogeno primario
- 2 biotipi:
 - APP biotipo 1 (NAD-dipendente)
 - APP biotipo 2 (NAD-indipendente)
- Patogenesi complessa:
 - adesine
 - esostossine: **ApxI, ApxII, ApxIII e ApxIV**



Actinobacillus pleuropneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no



- 19 sierotipi diversi (antigeni capsulari)

- APP biotipo 1 → sierotipi 1-12 e 15
- APP biotipo 2 → sierotipi 13 e 14 e 16-19

- Fino ad ora → siero-agglutinazione sierotipi 2, 7, 9 (... i più frequenti)
- Prossimamente → PCR multiplex per individuare tutti i sierotipi capsulari

Vet Microbiol. 2021 Apr;255:109021. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109021. Epub 2021 Feb 24.

Proposal of Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars

Oliver W Stringer¹, Janine T Bossé², Sonia Lacouture³, Marcelo Gottschalk³, László Fodor⁴, Øystein Angen⁵, Eduardo Velazquez⁶, Paul Penny⁶, Liancheng Lei⁷, Paul R Langford⁸, Yanwen Li¹



Actinobacillus pleuropneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DELLA TOSSINA ApxIV DI <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SU SIERO DI SANGUE SUINO TRAMITE ELISA INDIRETTA - KIT IDEXX APP-ApxIV	MP 04/147
--------------	--	-----------

- ELISA indiretta (Idexx) per anticorpi anti **ApxIV** prodotti da tutti i sierotipi di APP (vivi)
 - Test di screening

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SIEROTIPO 2 IN SIERO DI SANGUE DI SUINO TRAMITE ELISA INDIRETTA - Kit IDvet	MP 04/090
--------------	--	-----------

- ELISA indiretta (ID-vet) per anticorpi anti **antigeni capsulari** prodotti dai diversi sierotipi di APP (vivi e inattivati) → «sierogruppi» disponibili in IZSLER:

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SIEROTIPI 4 e 7 IN SIERO DI SANGUE SUINO TRAMITE ELISA INDIRETTA - Kit IDvet -	MP 04/091
--------------	---	-----------

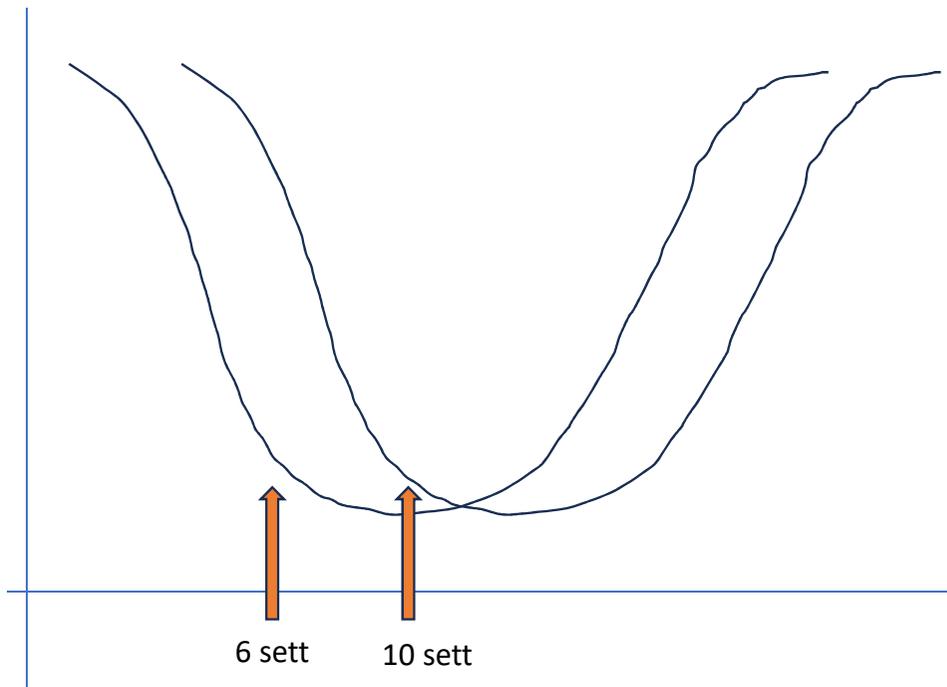
- 2
- 4, 7
- 1, 9, 11

I.Z.S.L.E.R.	METODO DI PROVA INTERNO PER LA RICERCA DI ANTICORPI NEI CONFRONTI DI <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> SIEROTIPI 1, 9 e 11 IN SIERO DI SANGUE SUINO TRAMITE ELISA INDIRETTA - Kit IDvet -	MP 04/092
--------------	---	-----------



Actinobacillus pleuropneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no



- Utilizzo in campo della sierologia
- Indagine sierologica per livelli di età (individuazione inizio esposizione al patogeno)
- **Posizionamento della vaccinazione**
 - Immunizzare dopo il calo dell'immunità materna:
 - Variabile in relazione al contatto dei riproduttori con il patogeno
 - **Attenzione !!!** Interferenza con l'immunità materna può arrivare fino a 10 settimane



Actinobacillus pleuropneumoniae

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	si	si	no



- Possibile !!!
- **Depopolazione parziale** e **medicazione strategica** dei riproduttori e dei suinetti lattanti
- Pre-requisiti (generali)
 - Sito 1 – Sito 2 – Sito 3
 - Alto livello di biosicurezza
 - Antibiotici efficaci per risanare le scrofe
 - Disinfettanti efficaci per risanare l'ambiente
 - Test per monitorare nel tempo la negatività e i riproduttori dichiarati «free» in entrata



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Clostridium perfringens e Clostridioides difficile

Gli anaerobi sporigeni «killer» dei primi giorni di vita



Clostridioides difficile e Clostridium perfringens

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si





Clostridium perfringens tipo C

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si

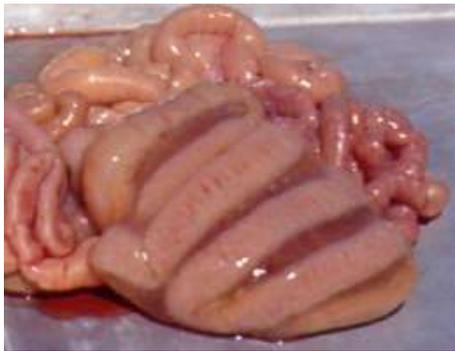


- Enterite necrotico-emorragica (può essere di tipo segmentale)
- Prevalentemente nel tratto digiunale
- Tasso di letalità: **100%**
- Primi giorni di vita



Clostridioides difficile

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si



Edema del mesocolon



Contenuto del colon



Versamenti sierosi in addome e torace



Edema del sottocute dell'addome

- Patologia della prima settimana
 - Diarrea pastosa o **costipazione**
 - Tossiemia ad evoluzione rapida – 24 h
 - I ceppi tossigeni producono **tossina A, tossina B e tossina binaria**)
-
- Lesioni macroscopiche:
 - Edema del mesocolon
 - Versamenti sierosi in torace e addome
 - Edema del sottocute dell'addome



C. perfringens tipo A e C. difficile ... associati

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si



Intestino di un suinetto sottoscrofa con infezione da C. perfringens tipo A e C. difficile.

- L'infezione da C. difficile è spesso associata a quella da C. perfringens tipo A
- Stessi fattori di rischio
 - Resistenza agli antibiotici (geni di resistenza)
 - Persistenza nell'ambiente (sporigeni) e scarsa efficacia dei «normali» disinfettanti
- Due tratti intestinali coinvolti
 - **Digiuno** per C. perfringens
 - **Colon** per C. difficile



C. perfringens e C. difficile

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si



- C. perfringens

- **Carica in UFC/g** di contenuto intestinale
- Per la valutazione della carica, tenere in considerazione il tempo tra la morte e la conservazione a temperatura di refrigerazione del campione
- Significativo in caso di numero elevato di UFC/g di contenuto intestinale (10^7 - 10^8)



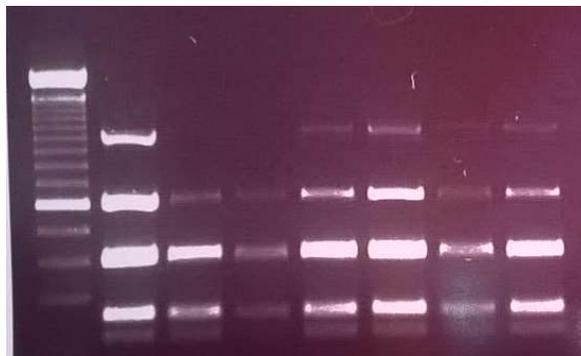
- C. difficile

- Semina su piastra dopo trattamento del campione (contenuto intestinale) con alcool etilico per 20 minuti
- Colonie non emolitiche con aspetto e odore caratteristico



C. perfringens e C. difficile

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si



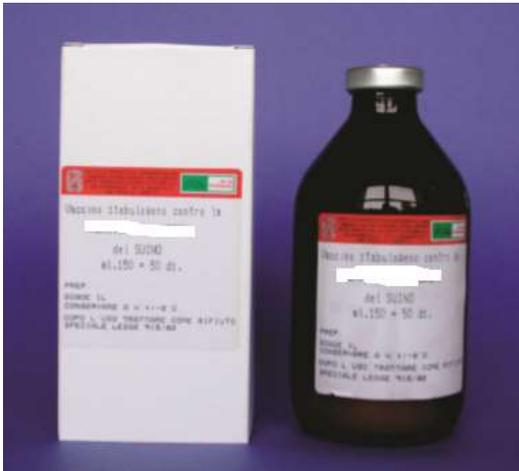
- C. perfringens
- Genotipizzazione mediante multiplex PCR
 - Tipo A: gene *cpa* (tossina alfa) spesso con presenza anche di *cpb2* (tossina beta2)
 - Tipo C: geni *cpa* e *cpb1* (tossina alfa e beta1)
- C. difficile
- Genotipizzazione mediante multiplex PCR
 - Ceppi tossigeni: portatori di geni per la **tossina A**, **tossina B** e **tossina binaria**.



C. perfringens e C. difficile

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	si	si (C. perf. ufc)	si	no	si

Possibile l'impiego del vaccino stabulogeno solo se i vaccini commerciali non hanno dato esito positivo



- Vaccino associato C. perfringens e C. difficile
- Somministrazione alle scrofe e scrofette
 - prima volta doppia somministrazione 6-3 settimane prima del parto
 - unico intervento nelle gravidanze successive



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Lawsonia intracellularis

Non possiamo coltivarla ma possiamo quantificarla

Vaccinazione → minor impiego di antibiotici

Forme sub-cliniche → riduzioni delle performance



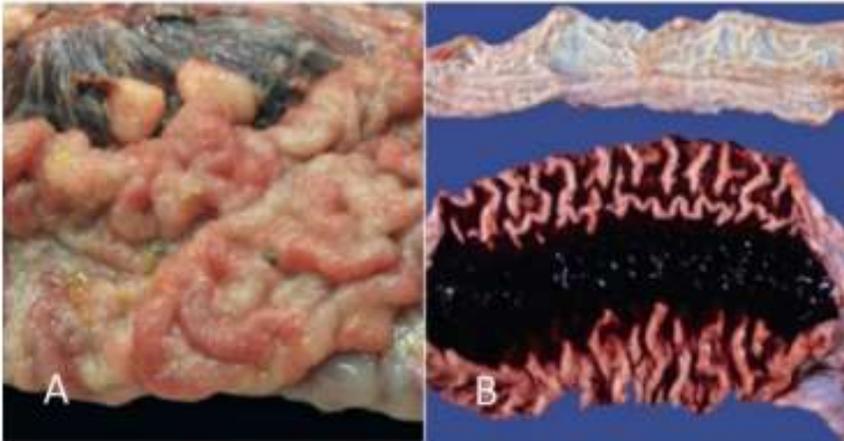
Lawsonia intracellularis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	MIC	Sierologia	Vaccino stab.
si	no	si	si (qPCR)	no	no	si	no



Gordon Lawson – Univ. Edimburgo

- Batterio intracellulare obbligato
- Enteropatia proliferativa del suino (G.Lawson 1985)
- Tardo svezzamento → **magronaggio** → **ingrasso**
- **Forme cliniche**
 - ileite proliferativa emorragica (letale acuta)
 - adenomatosi intestinale (forma clinica e sub-clinica)
- Conseguenze: mortalità (1-5%) e **riduzione delle performance** (forme sub-cliniche) anche del 7-10%



A) Adenomatosi intestinale B) Enteropatia proliferativa emorragica (source: Uzal et al. 2016)



Lawsonia intracellularis

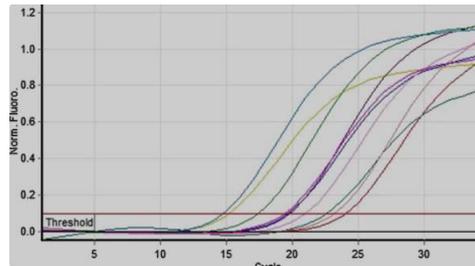
Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	MIC	Sierologia	Vaccino stab.
si	no	si	si (qPCR)	no	no	si	no



Campione di feci



10^4 - 10^5 copie genoma: f. sub-clinica
 10^6 - 10^7 copie genoma: f. clinica



qPCR

- La **carica batterica del patogeno nelle feci** è correlata con la gravità delle lesioni intestinali e con la riduzione delle performance.
- Attualmente **Real Time PCR con esito +/-**
- Quantificazione **qPCR di prossima applicazione**

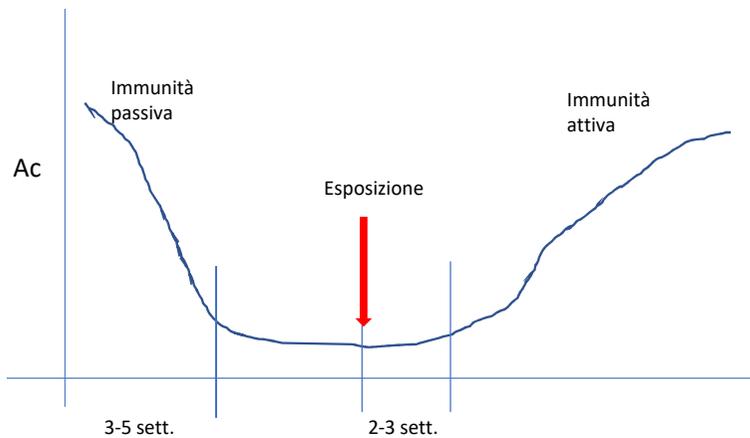


Lawsonia intracellularis

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	MIC	Sierologia	Vaccino stab.
si	no	si	si (qPCR)	no	no	si	no



- MP 04/011
- ELISA competitiva (SVANOVIR®)
- Applicazione in campo
 - Monitoraggio della presenza e diffusione del patogeno in allevamento nei vari settori
 - Posizionamento della vaccinazione (3-5 settimane prima dell'esposizione)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Staphylococcus hyicus

In alcuni casi focolai «devastanti»



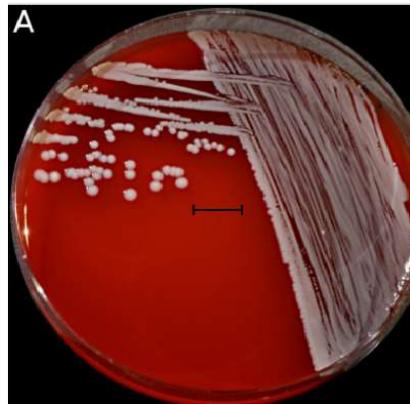
Staphylococcus hyicus

<i>Lesioni anat.pat.</i>	<i>Isolamento</i>	<i>PCR ident.</i>	<i>Quantificazione</i>	<i>Tipizzazione</i>	<i>Sierologia</i>	<i>Vaccino stab.</i>
si	si	no	no	no	no	si



Suinetto con epidermite essudativa

- **Epidermite essudativa**
- Da pochi giorni a 8 settimane di età
- Fattori di rischio molteplici: gestionali, ambientali, alimentari, virali (PRRS) ecc.



Staphylococcus hyicus (vetbact.org)

- Cocco Gram +
- Produce esotossine «esfolianti»
- Spesso associato con Staphylococcus aureus



Staphylococcus hyicus

Lesioni anat.pat.	Isolamento	PCR ident.	Quantificazione	Tipizzazione	Sierologia	Vaccino stab.
si	si	no	no	no	no	si



Vaccino stabulogeno emulsionato contro la EPIDERMITE ESSUDATIVA della Scrofa da Staphylococcus hyicus

Composizione

Culture inattivate di Staphylococcus hyicus (2 mld/ml).
Adjuvante: olii minerali

Indicazioni

Specie trattabili: suino.
Profilassi della Epidermite essudativa del suino accompagnata a misure igienico-sanitarie.

Modalità d'uso

Via di somministrazione: inoculare per via sottocutanea o intramuscolare nella fossetta retroauricolare.

Posologia: 2 ml(1 dose)/capo.

Schema vaccinale: due interventi distanziati di 3-4 settimane:

primo intervento 8 settimane prima del parto;

secondo intervento 3-4 settimane dal primo intervento;

Ripetere 4 settimane prima di ogni parto

Consumare il contenuto del flacone entro 15 giorni dall'apertura.

Conservare a 4 ± 3 °C. Dopo l'uso trattare come rifiuto speciale, legge 915/82.

Tempi di attesa

0 giorni.

Confezioni

Flaconi da 100 dosi (ml 200).

- La patologia è in genere **sporadica** e confinata in un determinato periodo temporale
- Controllati i **fattori di rischio** si ritorna, il più delle volte, ad una situazione normale
- In caso di persistenza del problema è possibile impiegare un **vaccino stabulogeno** nelle scrofe prima del parto
- Efficacia ???



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Trueperella pyogenes

Patogeno vecchio ... Patogeno nuovo



Trueperella pyogenes



Polmonite apostematosa multifocale da *Trueperella pyogenes*



Lesione alla coda in seguito a morsicatura



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Interpretazione del dato MIC nell'antibiogramma



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Test di sensibilità agli antibiotici

Esame effettuato in vitro per stabilire la sensibilità o resistenza di un batterio ad un antibiotico ...

... ha un valore predittivo dell'efficacia o meno di una eventuale terapia antibiotica



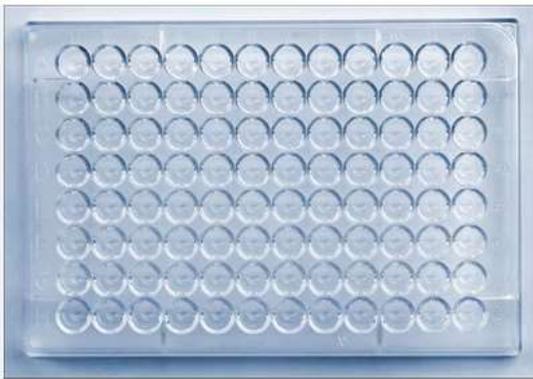
Metodo di Kirby-Bauer o disco-diffusione in agar (giudizio S-I-R)



Metodo con microdiluzione in brodo in piastre a 96 pozzetti (valore MIC e giudizio S-I-R)

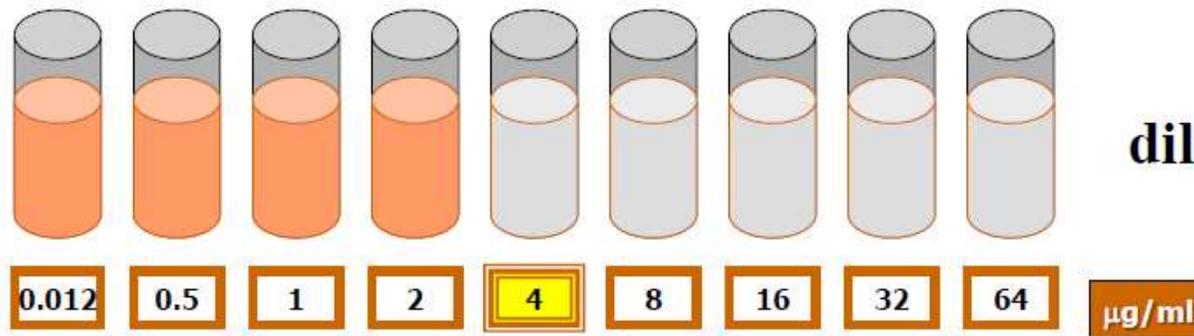


Come viene individuata la minima concentrazione inibente di una molecola (MIC) nei confronti di un ceppo batterico ...



- **STANDARDIZZAZIONE/ARMONIZZAZIONE**
- Quali molecole inserire
- Con quali range di concentrazione
- Quali parametri utilizzare per definire S-I-R (Breakpoints)
- Come esprimere il dato sul RPD

Progetto IIZZSS



diluizione in brodo

↑
MIC



Quali molecole inserire ...



- **Molecole prototipo rev. 6 - 2023**
- Definite dal **CRAB – IZS Roma**
- <https://www.izslt.it/crab/wp-content/uploads/sites/8/2023/11/Molecole-prototipo-e-loro-equivalenti-in-vitro.pdf>



MOLECOLA PROTOTIPO	MOLECOLE RAPPRESENTATE DAL PROTOTIPO
Penicillina G (benzilpenicillina) [¶]	Penicilline naturali: es. Penicillina G, Penicillina V (Fenossimetilpenicillina), Penetamato
Ampicillina	Ampicillina, Amoxicillina
Oxacillina [§]	Oxacillina, Meticillina, Cloxacillina, Nafcillina
Amoxicillina + ac. clavulanico [§]	Amoxicillina + ac. clavulanico
Cefazolina [¶] /Cefalotina	Cefalosporine di 1° generazione (orali e parenterali es. Cefaclor, Cefalessina: UTI non complicate da <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , oppure via endomammaria/endouterina nel bovino es. Cefacettrile, Cefapirina, Cefalonio)
Ceftiofur/Cefotaxime	Cefalosporine a spettro esteso (terza e quarta generazione) es. Ceftiofur, Cefoperazone Cefovecina (cani e gatti), Cefquinome
Clindamicina	Clindamicina, Lincomicina (Pirlimicina [¶])
Cloramfenicolo	Cloramfenicolo, Tiamfenicolo (Amfenicoli). Se esito AST è S, l'esito è rappresentativo anche per quello di Florfenicolo ^{**}
Florfenicolo	Florfenicolo
Tetraciclina	Tetraciclina, Clortetraciclina, Doxyciclina, Minociclina, Oxytetraciclina. Se esito AST è R, esito AST per Doxyciclina potrebbe ancora essere S (<i>Staphylococcus spp</i>) ^{***}
[Doxiciclina]	Doxiciclina, Tetraciclina (vedi sopra)
Trimetoprim-Sulfametozolo	Sulfonamidi potenziati con Trimetoprim
Sulfisoxazolo (Sulfametozolo)	Tutti i Sulfonamidi
Trimetoprim	Trimetoprim
Enrofloxacin/Ciprofloxacina	Enrofloxacin, Danofloxacin, Ciprofloxacina, Marbofloxacina, Orbifloxacina, Pradofloxacina (fluorochinoloni in genere)
Acido Nalidixico	Acido Nalidixico, Flumequine (chinolonici)
Streptomycin Kanamicina**** Gentamicina****	Streptomycin, Diidrostreptomycin Kanamicina, Neomicina (Framicetina), Paromomicina Gentamicina (Tobramicina), Apramicina
Amikacina	Amikacina
Spectinomycin	Spectinomycin (Aminociclitol) per <i>Pasteurellaceae</i> nei ruminanti
Eritromycin*****	Macrolidi (14-15 membered): Eritromycin, Tulatromycin e Gamitromycin (solo per <i>Pasteurellaceae</i> , es. <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> nei ruminanti),
Tilmicosina*****	Macrolidi (16-membered): Tilmicosina, Tildipirosina (solo per <i>Pasteurellaceae</i> , es. <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> nei ruminanti), Spiramicina, Tilvalosina, Tilosina
Spiramicina [°]	Spiramicina
Rifampicina	Rifamicine (Rifampicina, Rifaximina)
Tiamulina	Tiamulina (Pleuromutiline) per <i>A. pleuropneumoniae</i> nel suino



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
"BRUNO UBERTINI"

Quali parametri utilizzare per definire se un batterio è Sensibile/Intermedio/Resistente ?

Breakpoints clinici basati
su standard:
internazionali (CLSI vet-08)
europei (EUCAST 10.0)
francesi (CASFM 2019)



Table 2A. (Continued)

Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter (mm)			MIC Breakpoint (µg/mL)			Comments
		S	I	R	S	I	R	
Penicillin G Horses (Respiratory, Soft Tissue) <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	—	—	—	—	≤0.5	1	≥2.0	(14) Breakpoints derived from microbiological, pharmacokinetic data (using accepted clinical, but extra-label doses), and pharmacodynamic data. The dose of procaine penicillin G modeled was 22 000 U/kg, IM, every 24 hours.
Bovine Respiratory Disease <i>Mannheimia haemolytica</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Histophilus somni</i>	—	—	—	—	≤0.25	0.5	≥1.0	(15) Breakpoints derived from microbiological, pharmacokinetic data (using accepted clinical, but extra-label doses), and pharmacodynamic data. The dose of procaine penicillin G modeled was 22 000 U/kg, IM, every 24 hours.



Breakpoints clinici e giudizio S/I/R: SIGNIFICATO

Sensibile:

- Il livello di attività dell'antibiotico nei confronti del microrganismo è associato ad **un'elevata probabilità di successo terapeutico**



Intermedio:

- Il livello di attività dell'antibiotico nei confronti del microrganismo è associato ad un effetto terapeutico incerto. **Non è escluso** che l'infezione possa essere trattata appropriatamente in distretti corporei in cui il **farmaco è attivamente concentrato o utilizzando alti dosaggi**

Resistente:

- Il livello di attività dell'antibiotico nei confronti del microrganismo è associato ad **un'elevata probabilità di fallimento terapeutico**





A volte non viene riportato il giudizio S/I/R ma ...

Non
valutato

- Non esistono i valori di Breakpoint
- La molecola non è indicata per la terapia di quella specifica infezione
- Altre valutazioni attinenti l'uso prudente del farmaco

... in ogni caso il
valore di MIC è
sempre riportato



Pannelli nelle piastre per MIC con definizione dei range di concentrazione (esempi)

CLASSE	MOLECOLA	RANGE
Chinoloni	Flumequina	1-16
Aminopenicilline	Amoxicillina/Acido clavulanico	0,0625/0,125-16/32
Aminopenicilline	Ampicillina	0,01563-16
Cefalosporine III-IV Gen	Ceftiofur	0,0625-8
Fluorochinoloni	Enrofloxacin	0,03-2
Amfenicoli	Florfenicolo	0,25-8
Amminoglicosidi	Kanamicina	8-32
Amminoglicosidi	Spectinomicina	4-256
Tetracicline	Tetraciclina	0,125-16
Pleuromutiline	Tiamulina	8-32
Sulfamidici	Trimetoprim/Sulfonamidi	0,125/2,375-16/304
Macrolidi	Gamitromicina	2-16
Macrolidi	Tildipirosina	2-16
Macrolidi	Tilmicosina	0,25-64
Macrolidi	Tulatromicina	16-128

CLASSE	MOLECOLA	RANGE
Aminopenicilline potenziati	Amoxicillina + Ac.Clavulanico	0,25-16
Aminopenicilline	Ampicillina	0,03125-16
Cefalosporine I-II gen.	Cefazolina	0,25-8
Cefalosporine III gen.	Ceftiofur	0,25-8
Lincosamidi	Clindamicina	0,25-4
Fluorochinoloni	Enrofloxacin	0,03125-4
Macrolidi	Eritromicina	0,3125-8
Fenicoli	Florfenicolo	2-8
Aminoglicosidi	Kanamicina	8-32
Aminopenicilline	Oxacillina	0,25-4
Penicilline	Penicillina	0,03125-16
Rifamicine	Rifampicina	0,625-2
Sulfamidici	Sulfisoxazolo	128-512
Tetracicline	Tetraciclina	0,25-16Gram +
Macrolidi	Tilmicosina	8-32
Sulfamidici	Trimetoprim+Sulfonamidi	0,125-8

CLASSE	MOLECOLA	RANGE
Chinoloni	Flumequina	1-16
Aminopenicilline	Amoxicillina/Acido clavulanico	0,25/0,125-32/16
Aminopenicilline	Ampicillina	0,25-32
Cefalosporine I-II Gen	Cefazolina	0,5-8
Cefalosporine III Gen	Cefotaxima	0,5-4
Sulfamidico	Sulfisoxazolo	128 - 512
Polimixine	Polistina	0,03-8
Fluorochinoloni	Enrofloxacin	0,015625-32
Amfenicoli	Florfenicolo	1-64
Amminoglicosidi	Gentamicina	0,25-32
Tetracicline	Tetraciclina	0,5-16
Sulfamidici	Trimetoprim/Sulfametossazolo	0,0625/1,1875-16/304
Amminoglicosidi	Aminosidina	1-32
Amminoglicosidi	Kanamicina	2-32



Esempio: antibiogramma su Salmonella Typhimurium

Antibiogramma patogeni enterici gram- *Tecnica:* Microdiluizione in brodo

Metodo di prova: CLSI VET01:2018+CLSI VET06:2017+CLSI VET08:2018+CLSI M11:2018+CLSI M100:2019

Eziologico: Gen. Salmonella

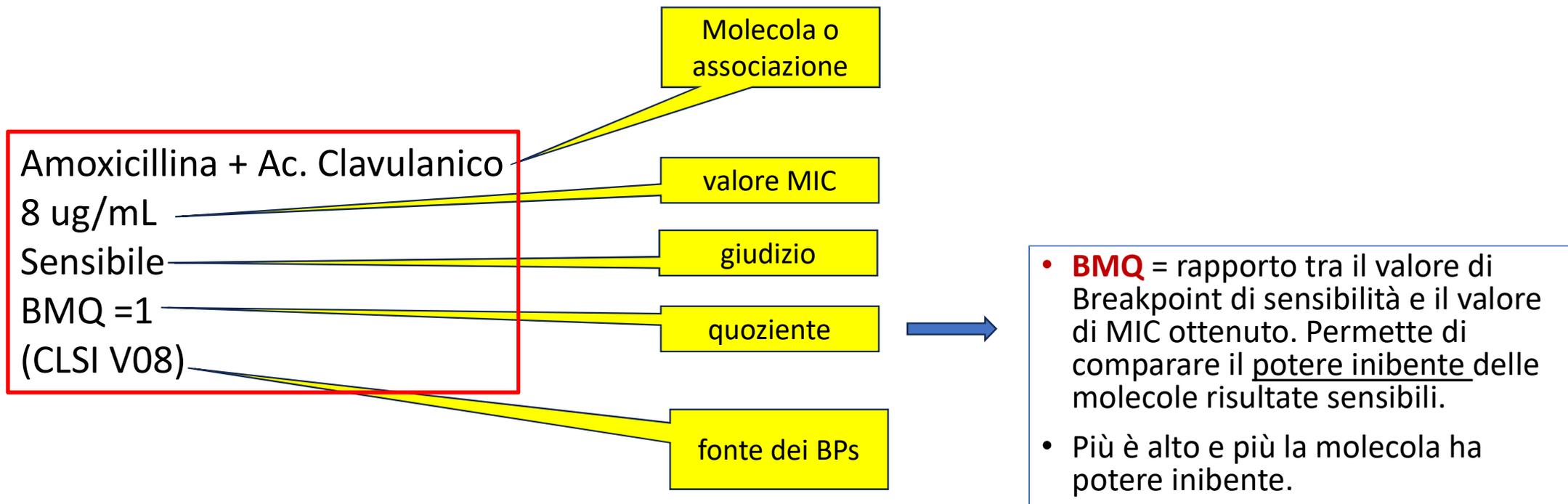
line n°: 1

Amminosidina = 2 µg/mL Non valutato	Amoxicillina + Ac.Clavulanico = 8 µg/mL. Sensibile BMQ=1 (CLSI V 08)	Ampicillina > 32 µg/mL Resistente (CLSI V 08)	Cefazolina = 8 µg/mL Resistente (CLSI V 08)	Cefotaxime ≤ 0.5 µg/mL Non valutato	Colistina = 0.5 µg/mL Sensibile BMQ=4 (EUCAST v.11)
Enrofloxacin = 0.0625 µg/mL Sensibile BMQ=1 (EUCAST v.11)	Florfenicolo > 64 µg/mL Resistente (CLSI V 08)	Flumequina ≤ 1 µg/mL Sensibile BMQ=4 (CASFM 2019)	Gentamicina = 0.5 µg/mL Non valutato	Kanamicina ≤ 2 µg/mL Non valutato	Sulfisoxazolo > 512 µg/mL Resistente (CLSI H M100)
Tetraciclina > 16 µg/mL Resistente (CLSI V 08)	Trimetoprim + Sulfonamidi > 16 µg/mL Resistente (CLSI V 08)				

- 14 molecole: 8 classi e 11 sottoclassi
- 3 riferimenti per i BP clinici (CLSI, EUCAST, CASFM)
- 10 molecole con giudizio S/I/R
- 4 molecole con assenza di giudizio (non valutato)



Penicilline + inib. betalattamasi





Amminoglicosidi

Amminosidina = 2 µg/mL Non valutato
Gentamicina = 0,5 µg/mL Non valutato
Kanamicina ≤ 2 µg/mL Non valutato

- NON VALUTATI

CLSI VET01S ED7:2024 — Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 7th Edition

B1. Enterobacterales (Continued)

Antimicrobial Agent	Ampicillin, Amoxicillin	Amoxicillin-clavulanate	Ampicillin-sulbactam	Cephalosporins I: Cefazolin, Cephalothin	Cephamycins: Cefoxitin, Cefotetan	Cephalosporins II: Cefuroxime	Imipenem	Tetracyclines	Nitrofurantoin	Polymyxin B, Colistin	Aminoglycosides
Organism											
<i>Proteus mirabilis</i>	There is no intrinsic resistance to penicillins and cephalosporins in this organism.						^d	R	R	R	
<i>Proteus vulgaris</i>	R			R		R	^d	R	R	R	
<i>Providencia stuartii</i>	R	R		R			^d	R	R	R	^e
<i>Raoultella</i> spp. ¹	R										
<i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> spp.	There is no intrinsic resistance to β-lactams in these organisms; refer to WARNING below for reporting.										
<i>Serratia marcescens</i>	R	R	R	R	R	R			R	R	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	R	R		R							
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>										R	

Abbreviations: AST, antimicrobial susceptibility testing; MIC, minimal inhibitory concentration; R, resistant.

WARNING: For *Salmonella* spp. and *Shigella* spp., aminoglycosides, first- and second-generation cephalosporins, and cephamycins may appear active *in vitro* but are not effective clinically and should not be reported as susceptible.



Beta-lattamine e Tetracicline

Ampicillina
> 32 µg/mL

Resistente

(CLSI V 08)

- Ampicillina
- Resistente

Tetraciclina
> 16 µg/mL

Resistente

(CLSI V 08)

- Tetraciclina
- Resistente



Cefalosporine

Cefazolina = 8 µg/mL Resistente (CLSI V 08)
--

Cefotaxime <= 0.5 µg/mL Non valutato
--

- Resistente per cefalosporina di prima generazione
- Non valutato per cefalosporina di terza generazione (cefotaxime)
- Molecola inserita come indicatore di ESBL
- La resistenza al cefotaxime indica un ceppo produttore di ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase)



Polimixine e Fenicoli

Colistina
= 0,5 µg/mL

Sensibile
BMQ=4
(EUCAST v.11)

- Colistina
- Sensibile

Florfenicolo
> 64 µg/mL

Resistente

(CLSI V 08)

- Florfenicolo
- **Resistente**



Chinoloni

Enrofloxacin
= 0,0625 µg/mL

Sensibile
BMQ=1
(EUCAST v.11)

Flumequina
≤ 1 µg/mL

Sensibile
BMQ=4
(CASFM 2019)

- Fluorochinoloni (chinoloni di terza generazione)
 - **Sensibile**

- Altri chinoloni (di seconda generazione)
 - **Sensibile**



Sulfamidici

Sulfisoxazolo
> 512 µg/mL

Resistente

(CLSI H M100)

- Sulfisoxazolo
- Resistente

Trimetoprim +
Sulfonamidi
> 16 µg/mL

Resistente

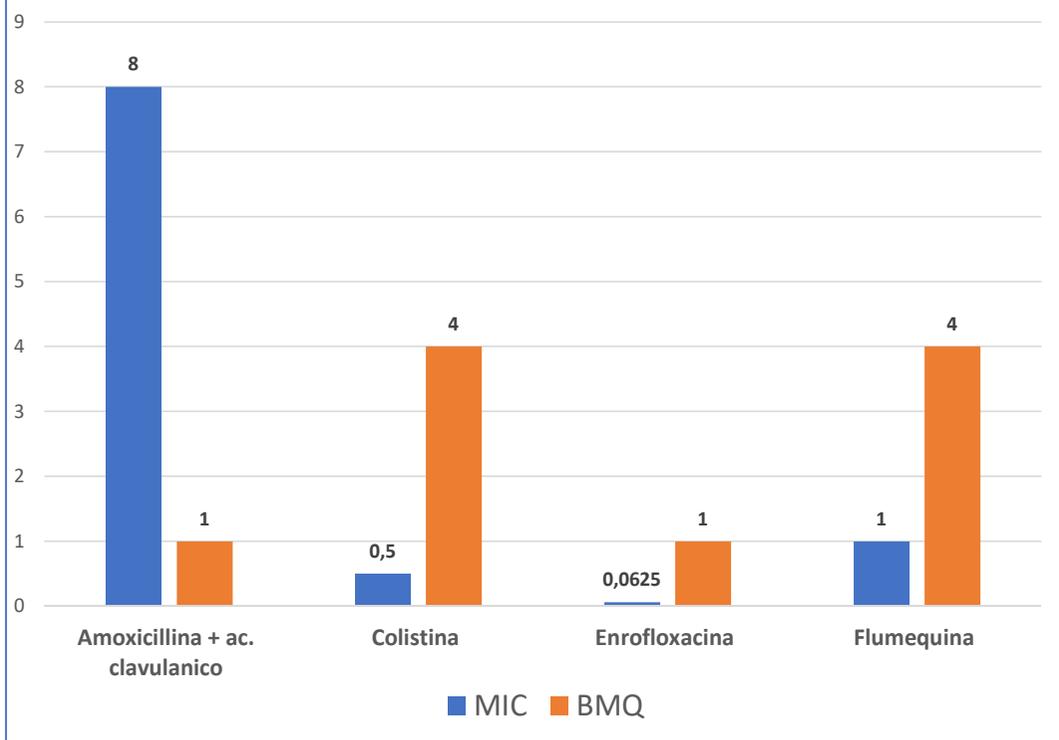
(CLSI V 08)

- Trimetoprim + Sulfonamidi
- Resistente



Sintesi del risultato dell'antibiogramma

MIC e Quoziente delle molecole sensibili



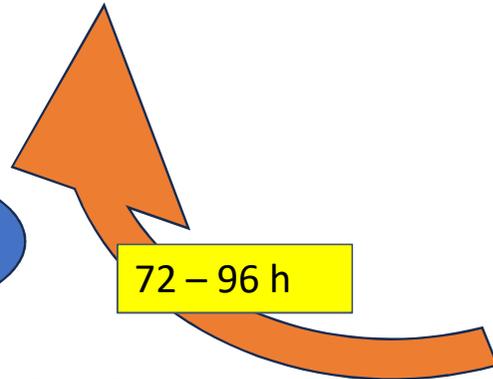
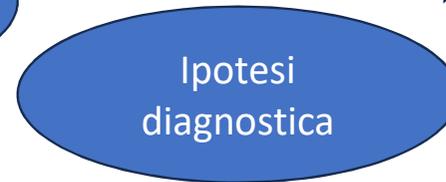
- Tre molecole **AMEG B**
 - Colistina
 - Enrofloxacin
 - Flumequina
- Una molecola **AMEG C**
 - Amoxic.+ ac.clav.



Percorso diagnostico - terapeutico

Terapia «mirata» – sulla base di dati oggettivi

Terapia «empirica» di emergenza – sulla base dei dati derivanti dalla propria esperienza, dei dati storici dell'allevamento, dei dati aggregati di un'area o settore.



72 - 96 h



Isolamento in
coltura pura



Contrastare i batteri patogeni significa ...

Preservare un «sano»
microbiota intestinale dei
suinetti

Eradicare quello che si può
eradicare

Impiegare vaccini e perfezionare
i protocolli

Conoscere i «patogeni» che
circolano in allevamento
(compresa la resistenza agli AM)

E' compito del laboratorio diagnostico veterinario produrre
dati utili a supporto del Veterinario in queste attività ...

Grazie