



“PATOLOGIA ENTERICA IN SALA PARTO E NEL POST-SVEZZAMENTO DIAGNOSI E CONTROLLO”

Andrea Luppi, DVM, PhD, Dipl. ECPHM

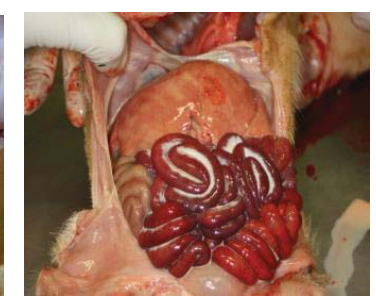
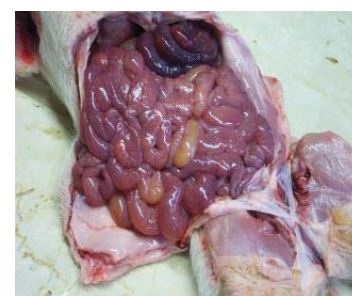
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
(IZSLER)



INTRODUZIONE

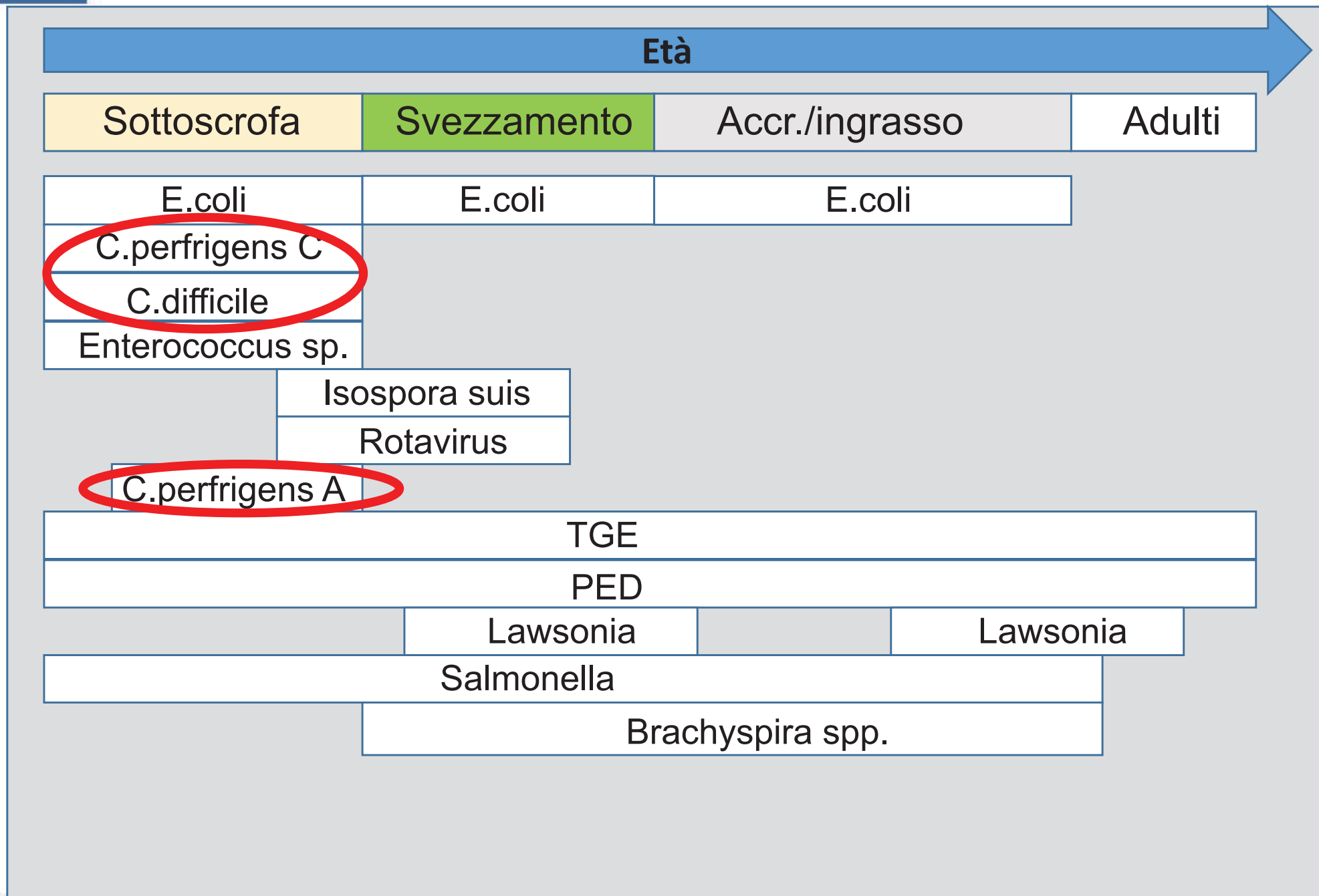


- I focolai di malattia enterica sono frequentemente **multifattoriali**
- Focalizzare la diagnosi e le successive strategie di controllo **su una singola causa può essere fuorviante**
- La **diagnosi** come punto di partenza essenziale per lo sviluppo di programmi di controllo
- Diagnosi di malattia vs **presenza** del patogeno
- **Misure di controllo**: quali limiti? quali resistenze?



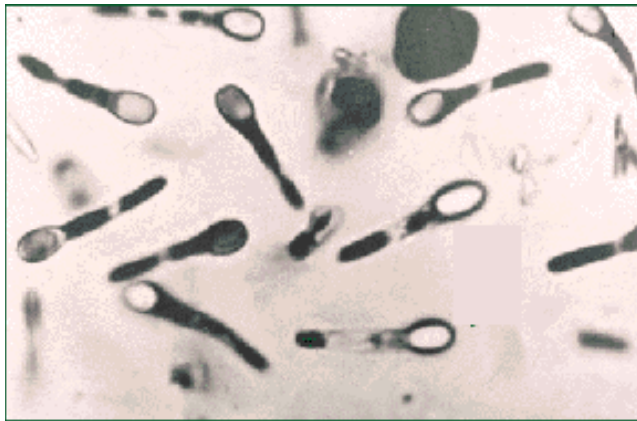


PRINCIPALI PATOLOGIE ENTERICHE del SUINO

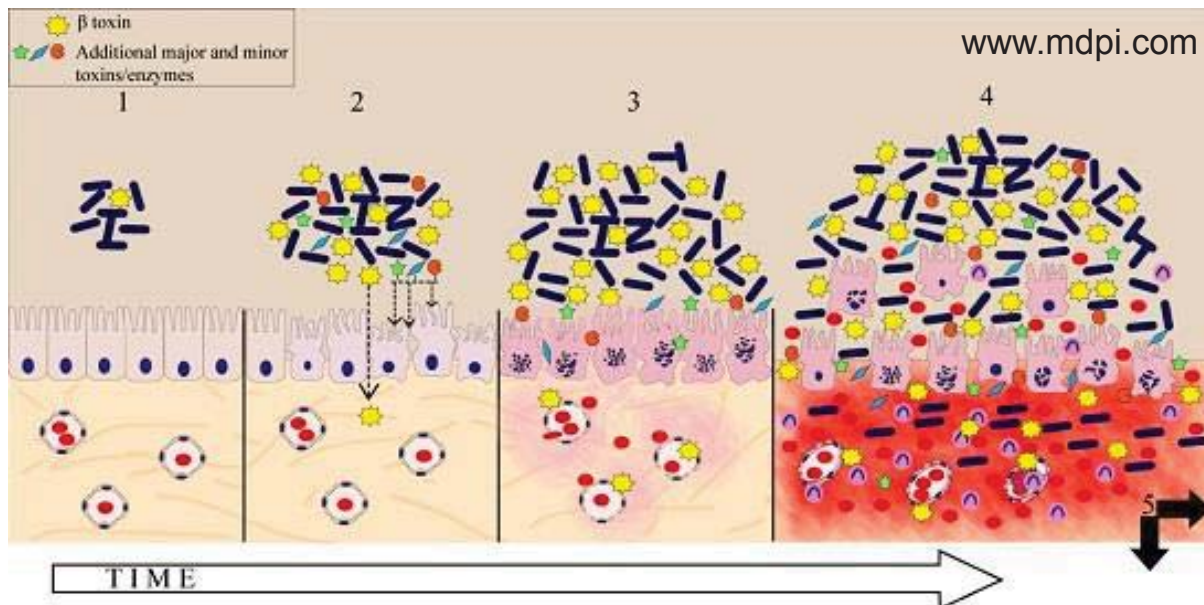




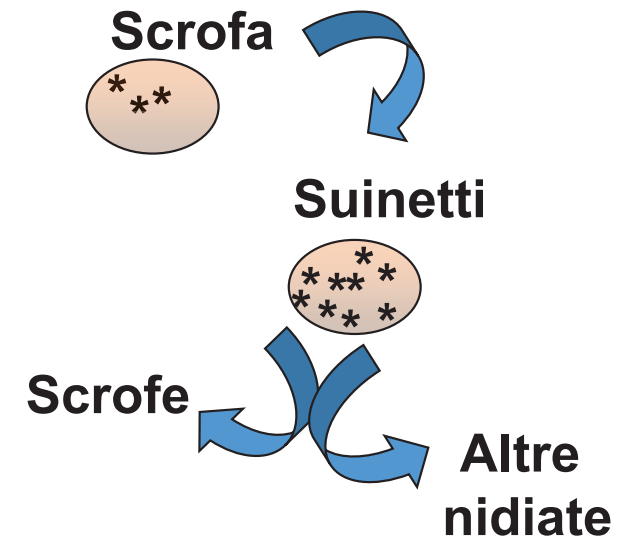
CLOSTRIDIOSI: epidemiologia



<http://textbookofbacteriology.net/>

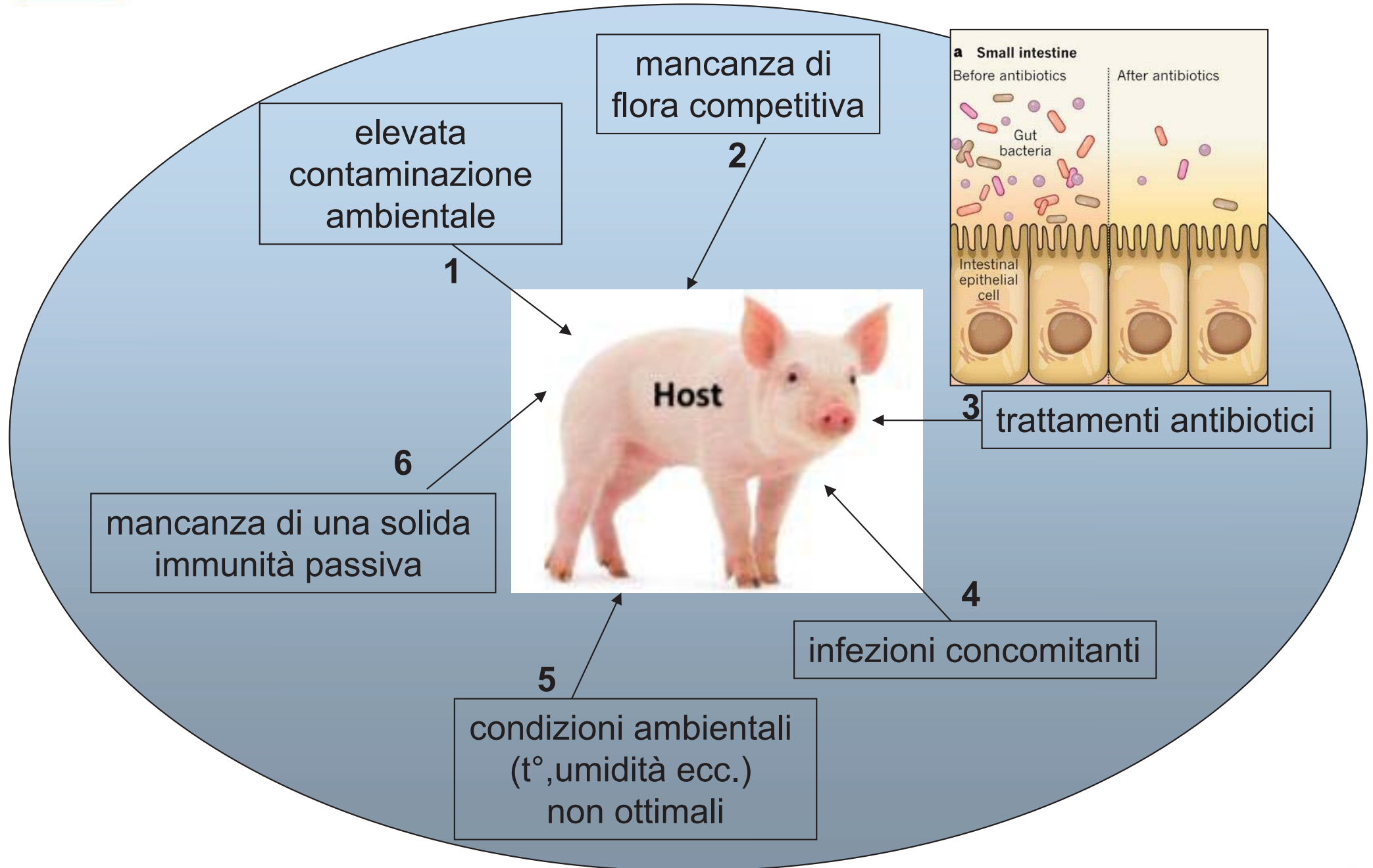


10^8 - 10^9 UFC/gr. feci





CLOSTRIDIOSI: fattori predisponenti





CLOSTRIDIOSI: aspetti diagnostici



Patogeno	Età comparsa	Tipo di diarrea	Tratto di intestino coinvolto	Mortalità	Esami di laboratorio
<i>C.perfringens</i> type C	PA: 1 gg A: 3 gg SA: 7 gg C: 10-14 gg	PA: acquosa con sangue A: bruna con sangue SA: acquosa grigio-gialla C: grigio-gialla	Digiuno ed ileo Enterite emorragica Ascite	100% nella forma PA e A	Esame colturale Genotipizzazione Istopatologia

Enterite necrotico emorragica segmentale o diffusa



Tossine: Alfa-beta-beta2



CLOSTRIDIOSI: aspetti diagnostici

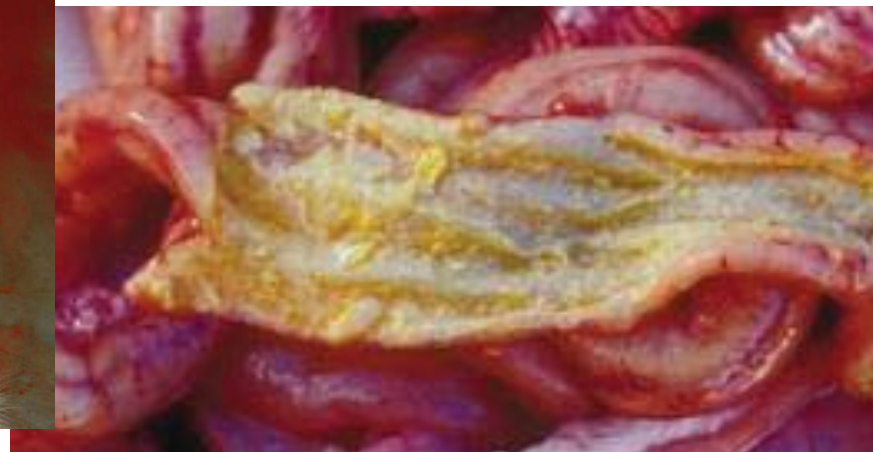


Patogeno	Età comparsa	Tipo di diarrea	Tratto di intestino coinvolto	Mortalità	Esami di laboratorio
<i>C.perfringens</i> type A	Diarrea nelle 48 ore dalla nascita (1° settimana di vita)	Mucoide, rosa senza sangue	Digiuno ed ileo Presenza di membrane necrotiche	Bassa se non complicata	Esame colturale Genotipizzazione Istopatologia

Enterite necrotizzante



Tossine: Alfa-beta2



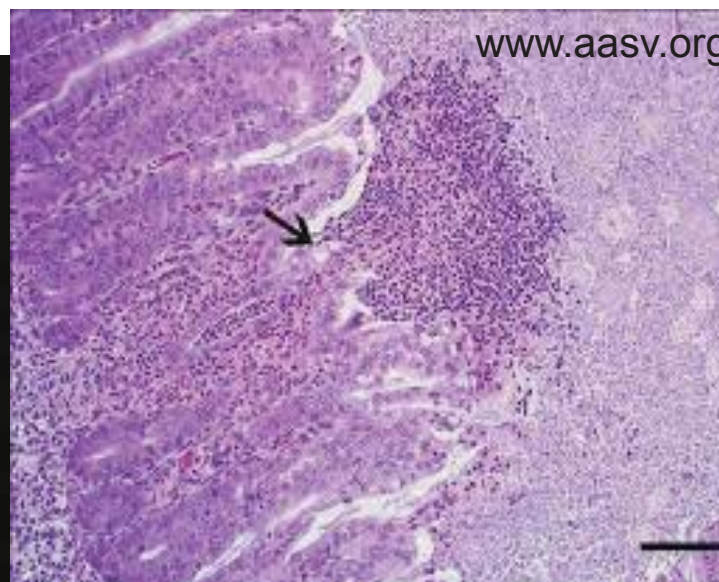
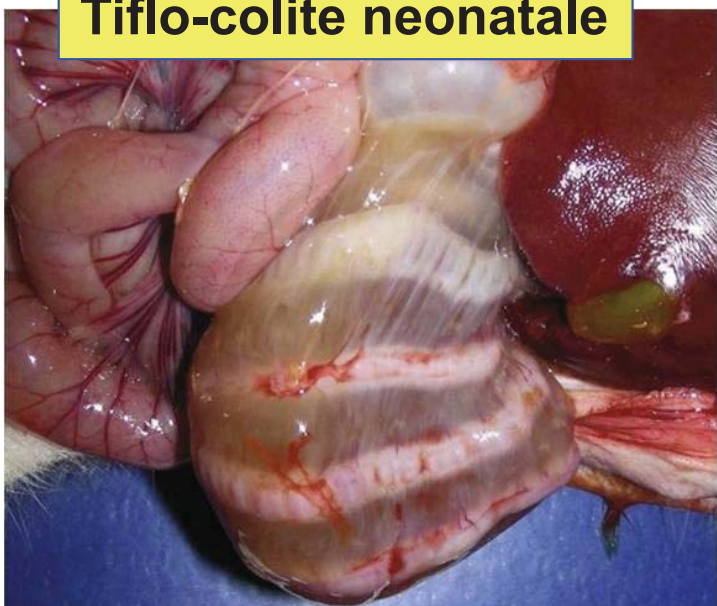


CLOSTRIDIOSI: aspetti diagnostici



Patogeno	Età comparsa	Tipo di diarrea	Tratto di intestino coinvolto	Mortalità	Esami di laboratorio
<i>Clostridium difficile</i>	Nella prima settimana di vita	Cremosa e gialla	Edema del mesocolon Tiflocolite con erosioni focali	Variabile. Fino al 50%	Esame colturale Identificazione della tossina Istopatologia

Tiflo-colite neonatale



Tossine: TcdA –TcdB - Tossina Binaria



CLOSTRIDIOSI E CAMPIONAMENTO



- **3-5 suini sintomatici** non trattati (feci, carcasse, intestini, tamponi rettali)
- Suini eutanizzati o morti recentemente <4 ore. I clostridi **proliferano rapidamente** dopo la morte
- *C.perfringens* **tipo A**, in particolare, normale abitante dell'intestino
- **Possibili falsi positivi** (valutazione quantitativa)
- **Refrigerazione** (+4°C). In caso di sospetta tifo-colite neonatale preferibile il **congelamento** (-20°C)



CONFERMA DI LABORATORIO



Clostridium perfringens

- **Isolamento e conta**
- **Conferma: CAMP TEST reverse**
- **Genotipizzazione: geni codificanti le principali tossine**

10⁷ UFC/gr



Tipo C	Alfa + Beta +Beta2
Tipo A	Alfa + Beta2

- **Differenti criteri diagnostici**
Isolamento *C.perfringens* tipo C
Isolamento *C.perfringens* tipo A
Ricerca diretta delle tossine
Esame istologico



CONFERMA DI LABORATORIO



Tossine termolabili

Clostridium difficile

- **Standard diagnostico:** determinazione delle tossine TcdA e TcdB
- Isolamento scarsa rilevanza senza la determinazione delle tossine
- **Sensibilità agli antibiotici** (necessario l'utilizzo di metodi specifici in microdiluizione).
- **Disco-diffusione** non affidabile
- In genere elevata sensibilità.

Resistenze: Eritromicina 30%



Clindamicina 28%

Tetracicline 93%



Tetraciclina

Lincomicina

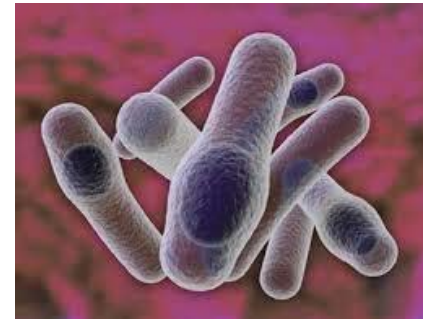




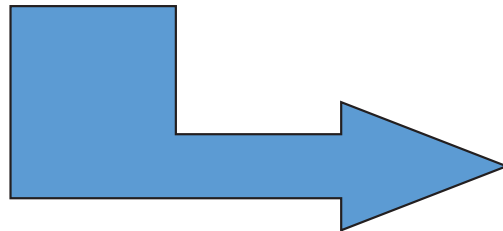
CONTROLLO



Clostridium perfringens tipo C e A



- **Sanificazione sala parto**
- **Igiene** delle scrofe
- **Terapia antibiotica:** nelle forme sub-acute o croniche
- Trattamenti “metafilattici” antibiotici nei suinetti e scrofe (per prevenire le forme acute)
- **Immunizzazione delle scrofe**



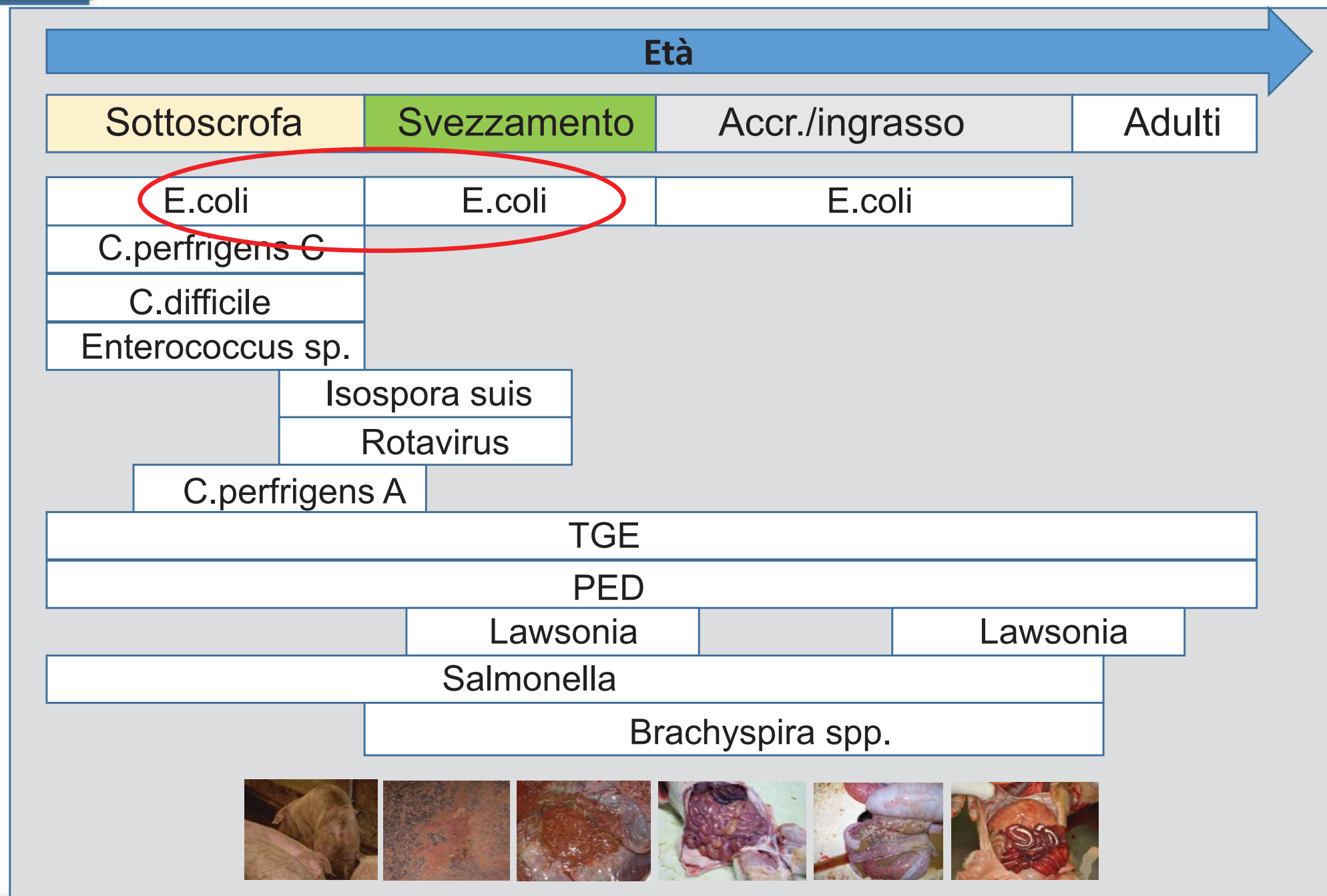
Vaccini contenenti l'**anatossina beta** di *C.perfringens* tipo C

Clostridium difficile

- **Sanificazione sala parto/Igiene scrofe**
- **Trattamento antibiotico** terapeutico e/o metafilattico (es. Macrolidi)



DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE PRINCIPALI PATOLOGIE ENTERICHE





CLASSIFICAZIONE



PATOTIPO	ADESINE	TOSSINE	MALATTIA
ETEC	F5 (K99), F6, F41	Sta	Diarrea neonatale
	F4 (K88)	STa, STb, LT, EAST-1, α -emolisina	
	F4 (K88), F18	STa, STb, LT, EAST-1, α -emolisina	PWD
EPEC	Eae	-	PWD
EDEC	F18	Stx2e	ED
ExPEC	P, S	CNF	Colisetticemia, polisierosite

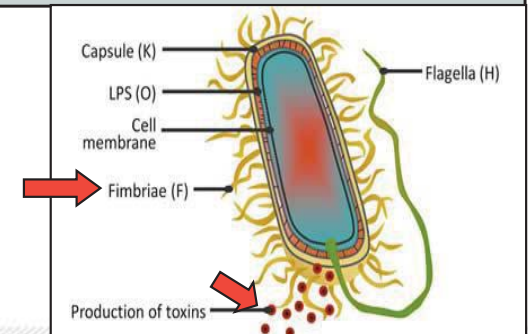
STa/STb: tossine termostabili

LT: tossina termolabile

EAST-1: tossina termostabile enteroaggregativa

Stx2e: tossina Shiga-like

CNF: fattore citotossico necrotizzante





FATTORI PREDISPONENTI



OSPITE

Età
Recettori
Immunità
Stress
Altre infezioni
Acidità gastrica
Flora competitiva

AMBIENTE

Carica batterica
Ruolo scrofa
Sovraffollamento
Escursioni termiche
Cambio dieta

E.coli

Fimbrie
Tossine
AR



DIARREA POST-SVEZZAMENTO



Svezzamento

**Periodo
allattamento**

↓ Assorbimento

↑ Permeabilità



**Immunità
passiva**

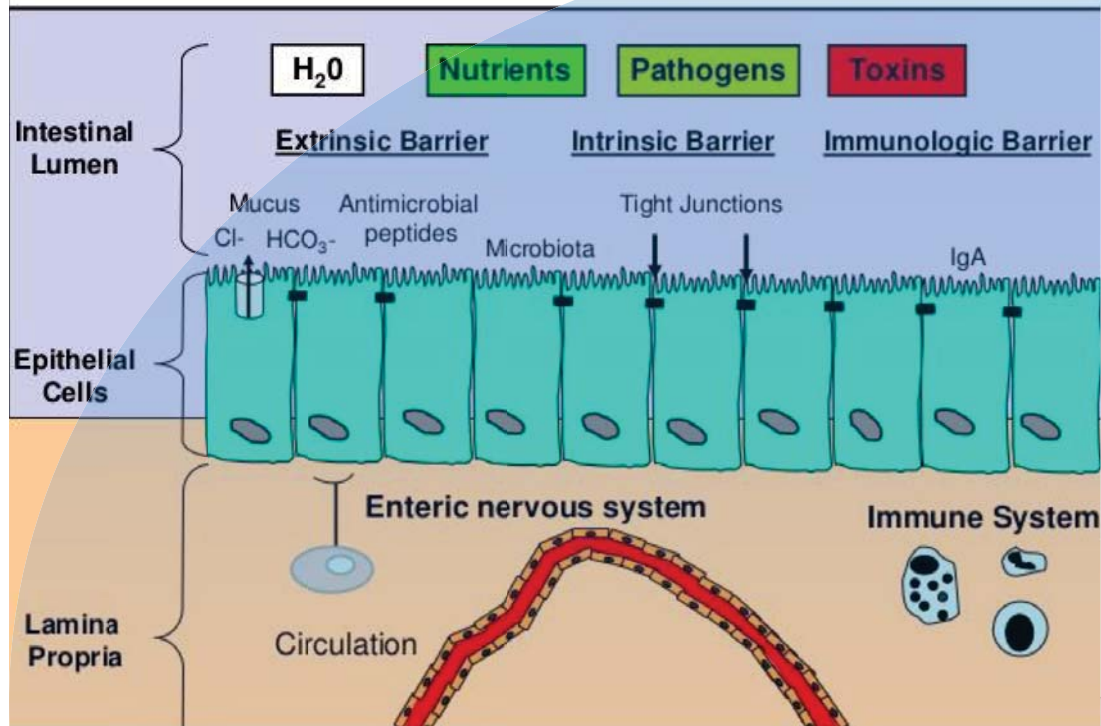
**Cambio
alimentazione**

**Compromissione
mucosa intestinale**

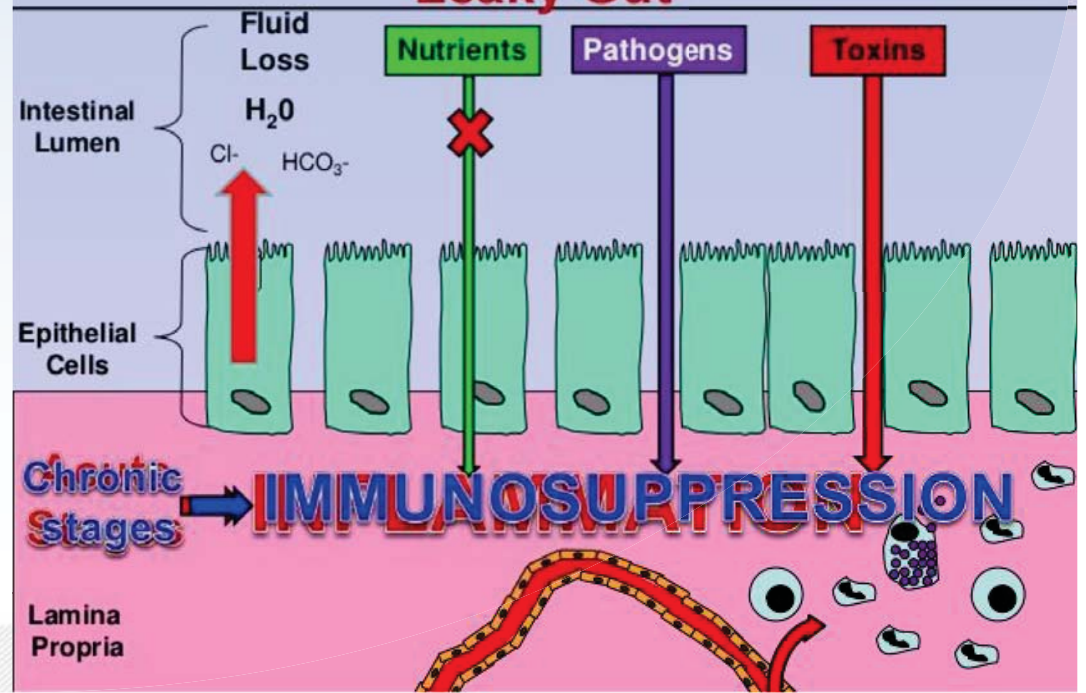
4°-7° g. P.S. - Riduzione
altezza villi 30-40%

**Momentaneo
rallentamento
sviluppo intestinale**

The Gastrointestinal Barrier

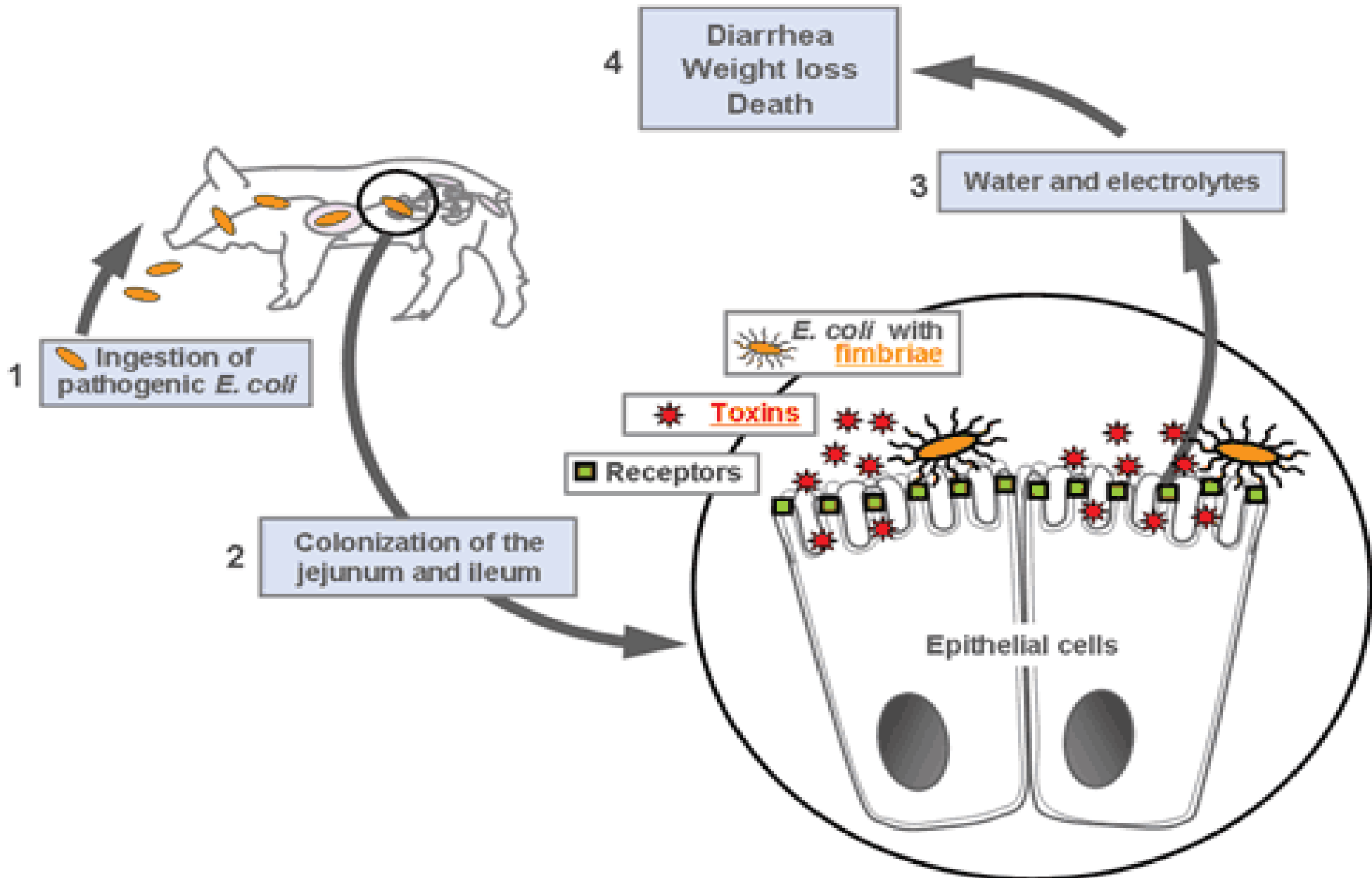


Compromised Barrier Under Stress: "Leaky Gut"



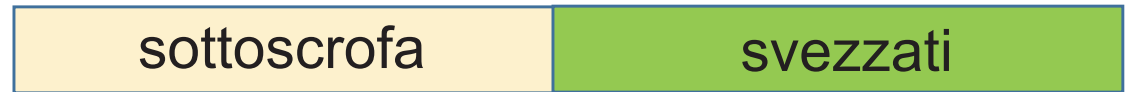


ETEC: PATOGENESI





MANIFESTAZIONI CLINICHE E DIAGNOSI



Diarrea:	gialla grigia rosa	gialla grigia rosa
Insorgenza:	0-4 gg	2-3 settimane PW
Mortalita':	Fino a 70%	Fino a 25%
	Disoressia, depressione, pH	





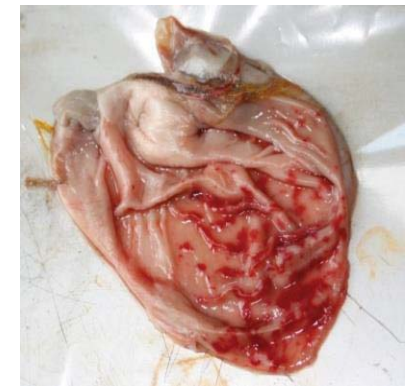
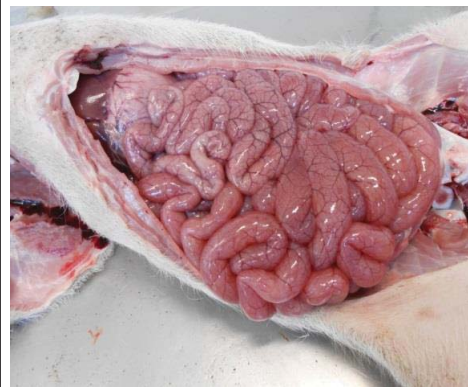
QUALI SONO I PASSI SUCCESSIVI?



Selezionare un numero di suini (3-5) non trattati e nella fase acuta della malattia



LESIONI MACROSCOPICHE



Lesioni tipiche di colibacillosi enterica.

Piccolo intestino (digiuno e ileo) e **grosso intestino**

Tamponi rettali



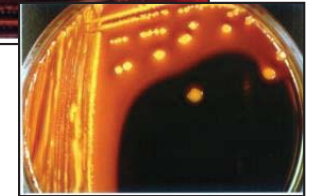
LE INFORMAZIONI DAL LABORATORIO



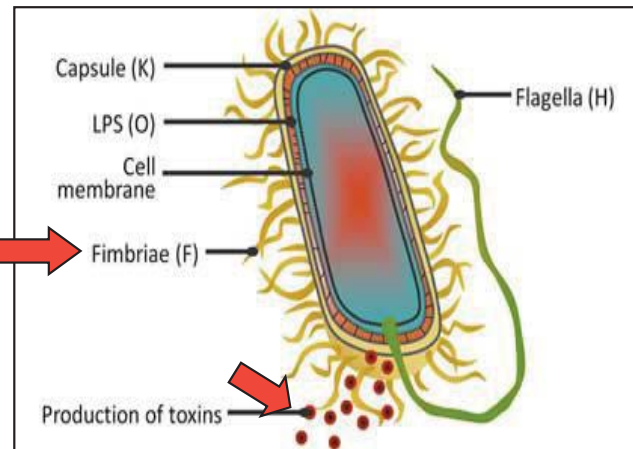
La diagnosi definitiva richiede la combinazione di diverse metodiche



- Isolamento di *Escherichia coli*
- Conferma biochimica



- Sierotipizzazione e genotipizzazione



PCR

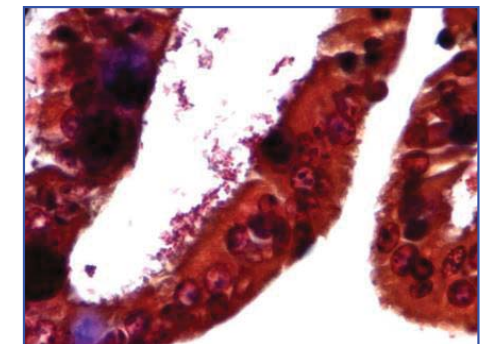
Fimbrie

F4, F5, F6, F18, F41

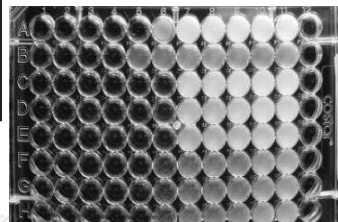
Tossine

STa, STb, LT, Stx2e and EAST1

- Istopatologia



- Sensibilità antibiotica

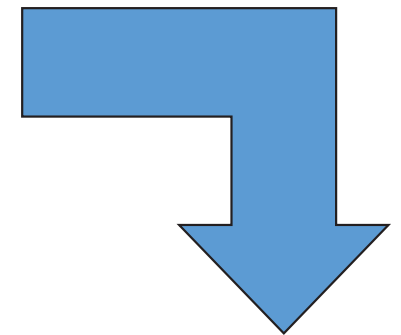


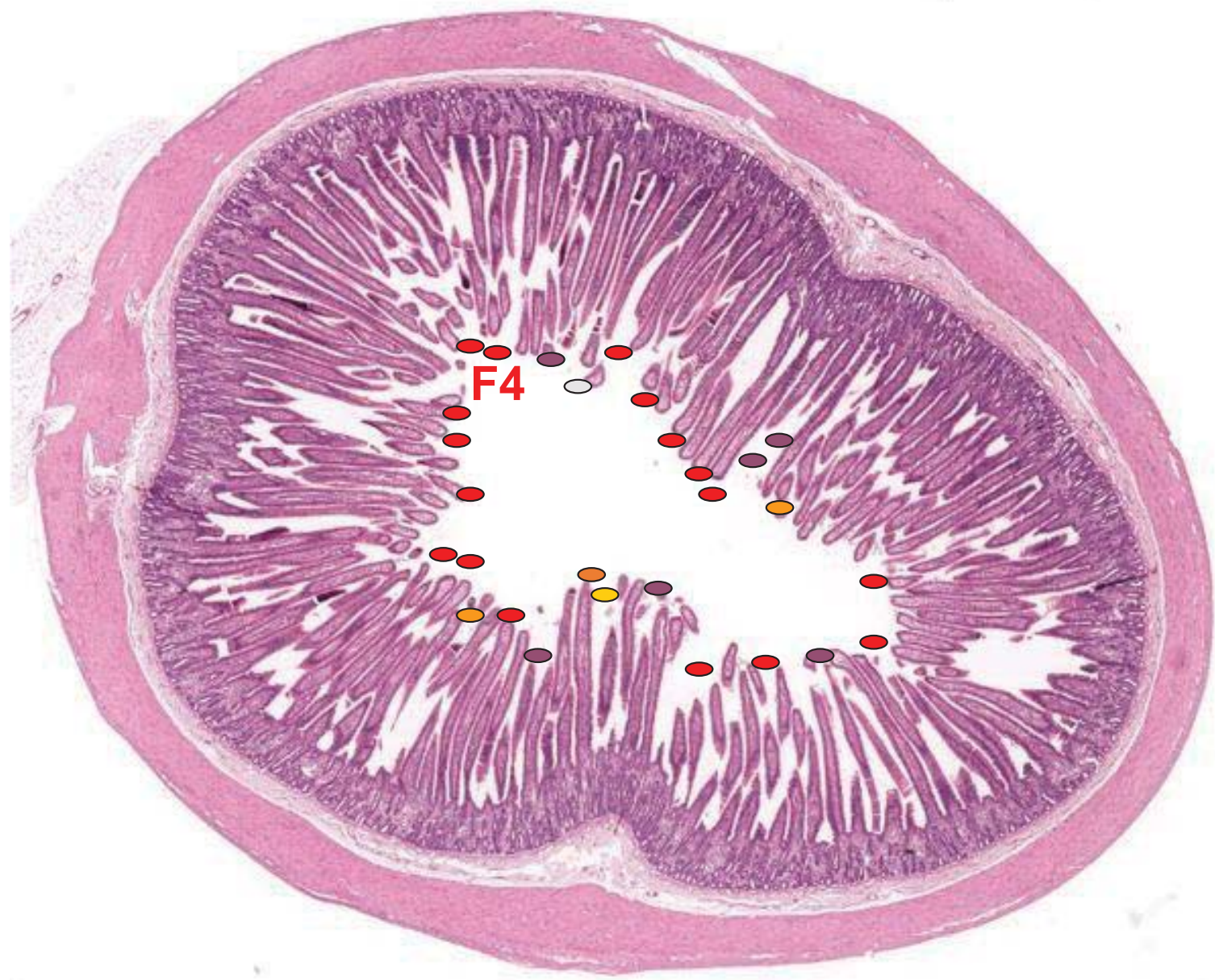


DIAGNOSI VS ANALISI



- ETEC: **emolitici** o **non emolitici** su agar sangue
- **Cultura pura**
- Importante la “concentrazione” di *E.coli* patogeno isolato





F4



DIAGNOSI VS ANALISI



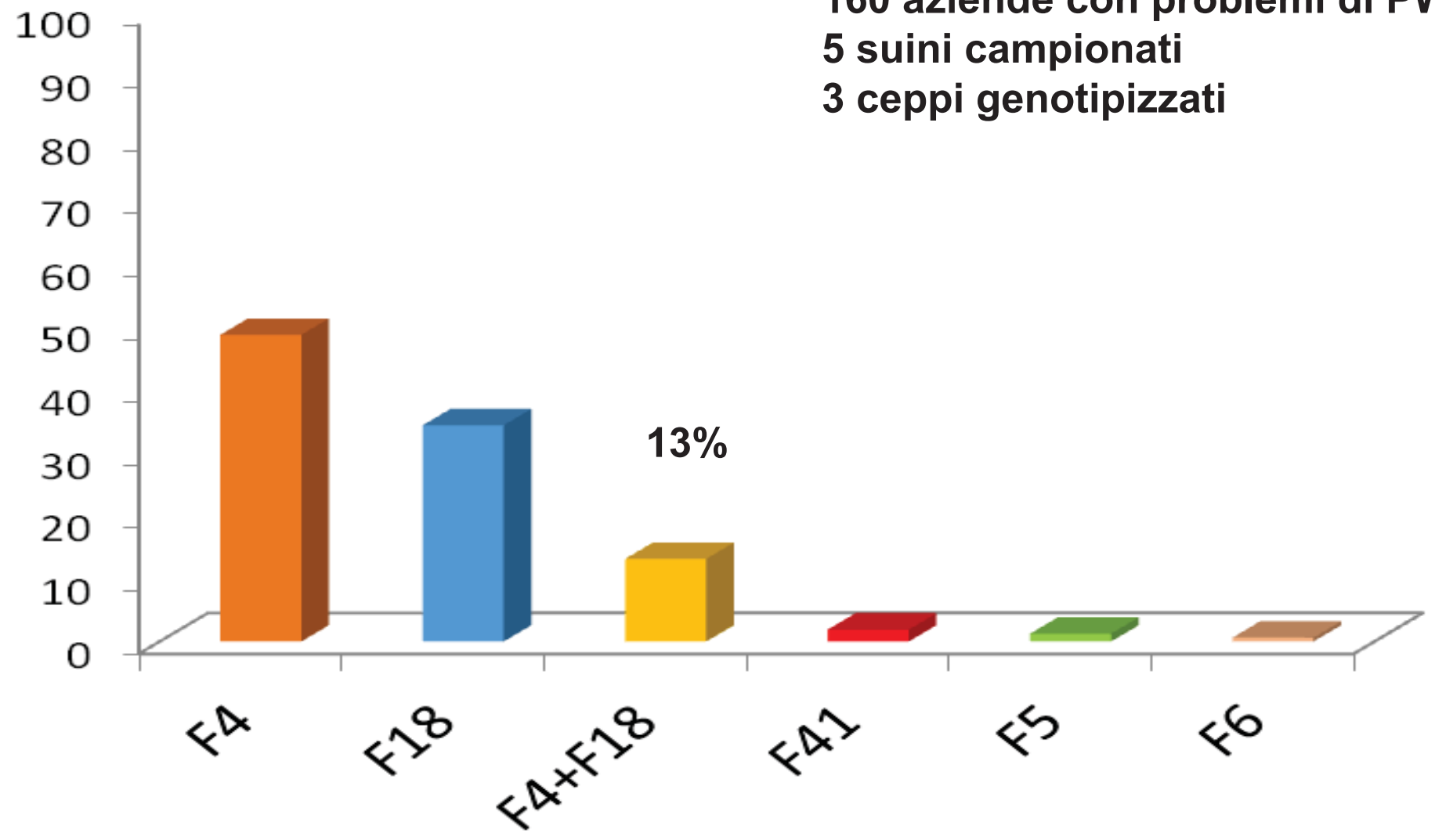
- ETEC: **emolitici** o **non emolitici** su agar sangue
- **Cultura pura**
- Importante la “concentrazione” di *E.coli* patogeno isolato



- Generalmente un focolaio di Colibacillosi è sostenuto da solo un ceppo patogeno prevalente
- Tuttavia **infezioni miste con isolamento di diversi virotipi** nello stesso focolaio sono possibili

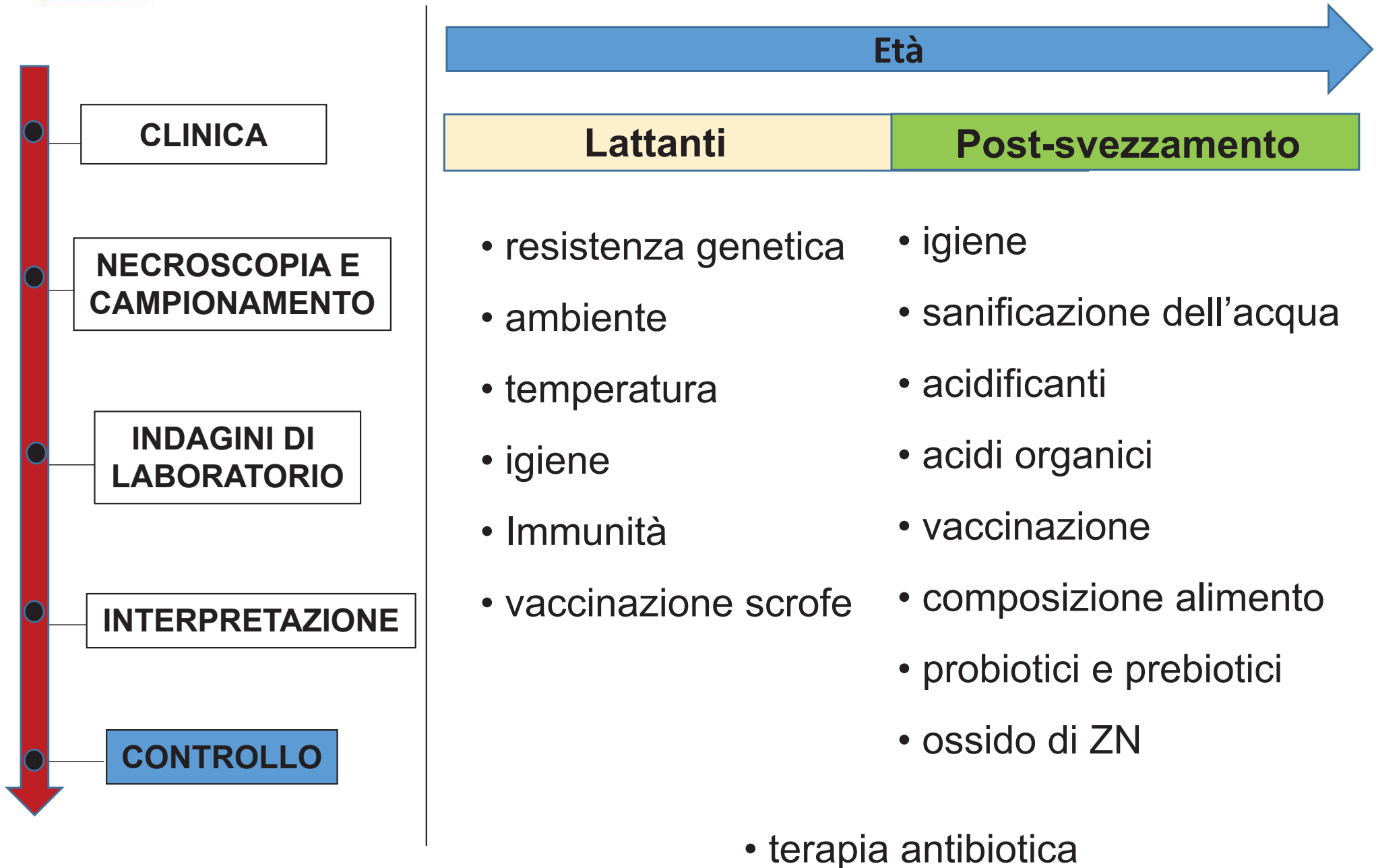


160 aziende con problemi di PWD
5 suini campionati
3 ceppi genotipizzati



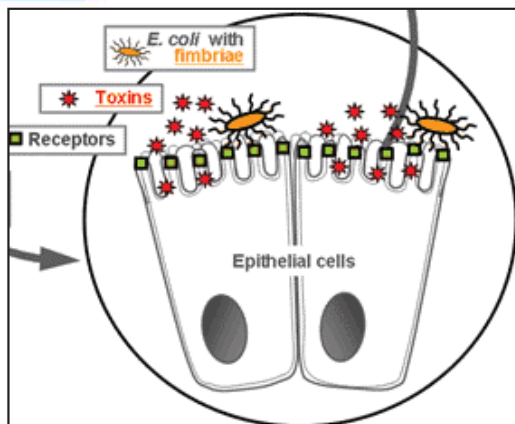


GESTIONE SANITARIA DELLA COLIBACILLOSI





VACCINAZIONE

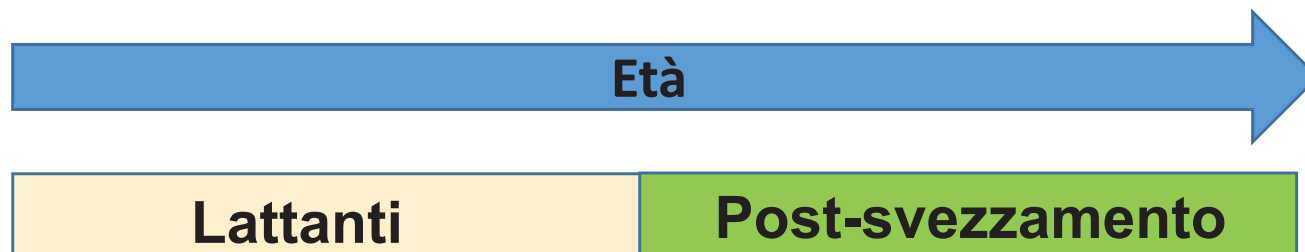


Target

Via di somm.

Immunità/Ig prevalenti

Tipo di vaccino



Scrofa

Suinetto

Parenterale

Orale

Colostrale/lattogenica (IgG/IgA)

Mucosale (IgA)

Antigeni fimbriali

Antigeni fimbriali

TERAPIA ANTIBIOTICA: LO STATO DELL'ARTE



**Terapia
Metafilassi
Profilassi**

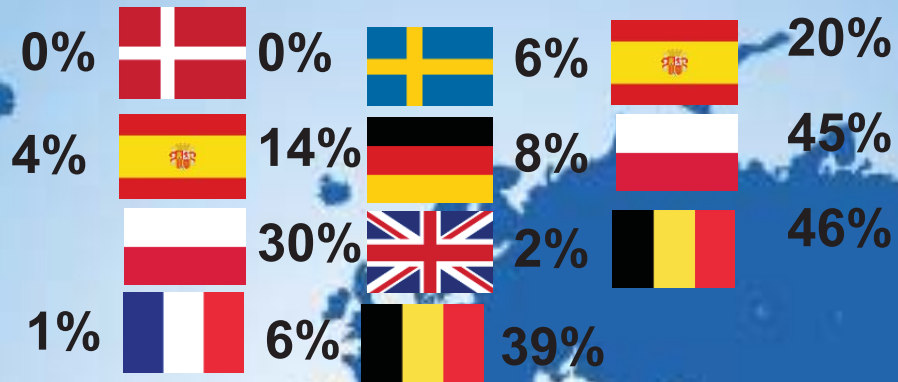
Quali antibiotici?

Via parenterale e orale

AR e ETEC

**Situazione differente tra
diversi Paesi**

Ceftiofur **Aarestrup et al., 2008** **Fluoroquinolones** **Gentamicin**



Yasphal et al., 2011



Enrofloxacin 0%
 Ceftiofur 22%
 Tetracycline 97%
 SXT 23%
 Gentamicin 48%



Costa et al., 2010

Enrofloxacin 30%
 Cefalexin 44%
 Tetracycline 69%
 SXT 62%
 Gentamicin 39%

Tetracycline 76-100%
 SXT 39-79%

Jiang et al., 2011



Enrofloxacin 64%
 Cefalexin 7%
 Tetracycline 98%
 SXT 90%
 Gentamicin 57%

Lee et al., 2009



Enrofloxacin 65%
 3rd g. Cephal. 0%
 Tetracycline 97%
 SXT 76%
 Gentamicin 77%

Smith et al., 2011



Enrofloxacin 0%
 Ceftiofur 0%
 Tetracycline 69%
 SXT 52%

ORIGINAL ARTICLE

Antimicrobial Resistance of F4+ *Escherichia Coli* Isolated from Swine in Italy

A. Luppi¹, P. Bonilauri¹, M. Dottori¹, Y. GherPELLI¹, G. Biasi¹, G. MeriALDI¹, G. Maioli¹ and P. Martelli²

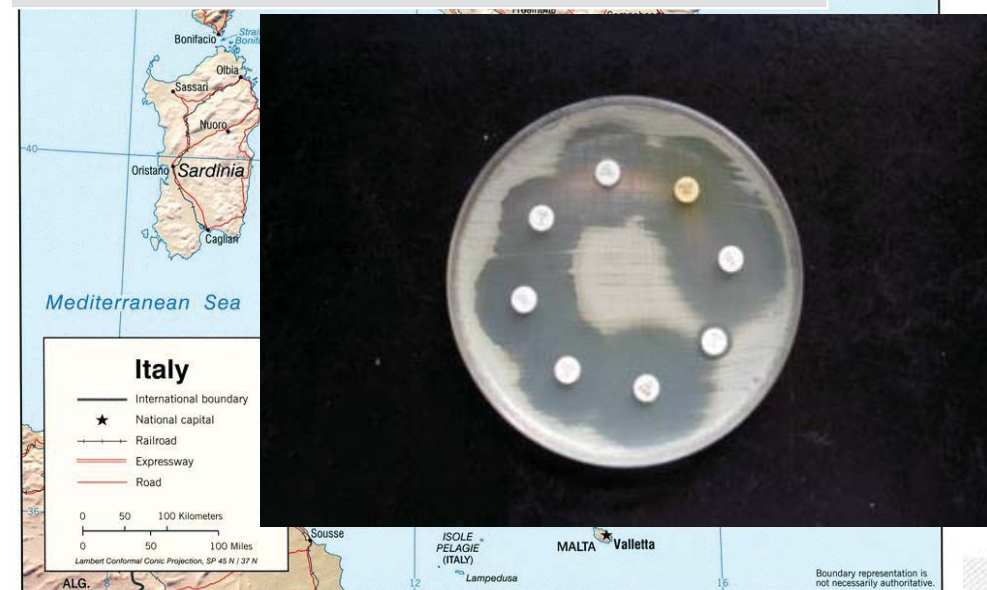
¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia, Italy

² Department of Animal Health, University of Parma, Parma, Italy

- 442 ceppi di E.coli F4+
- Isolati da suini con PWD



Sensibilità a 12 antibiotici



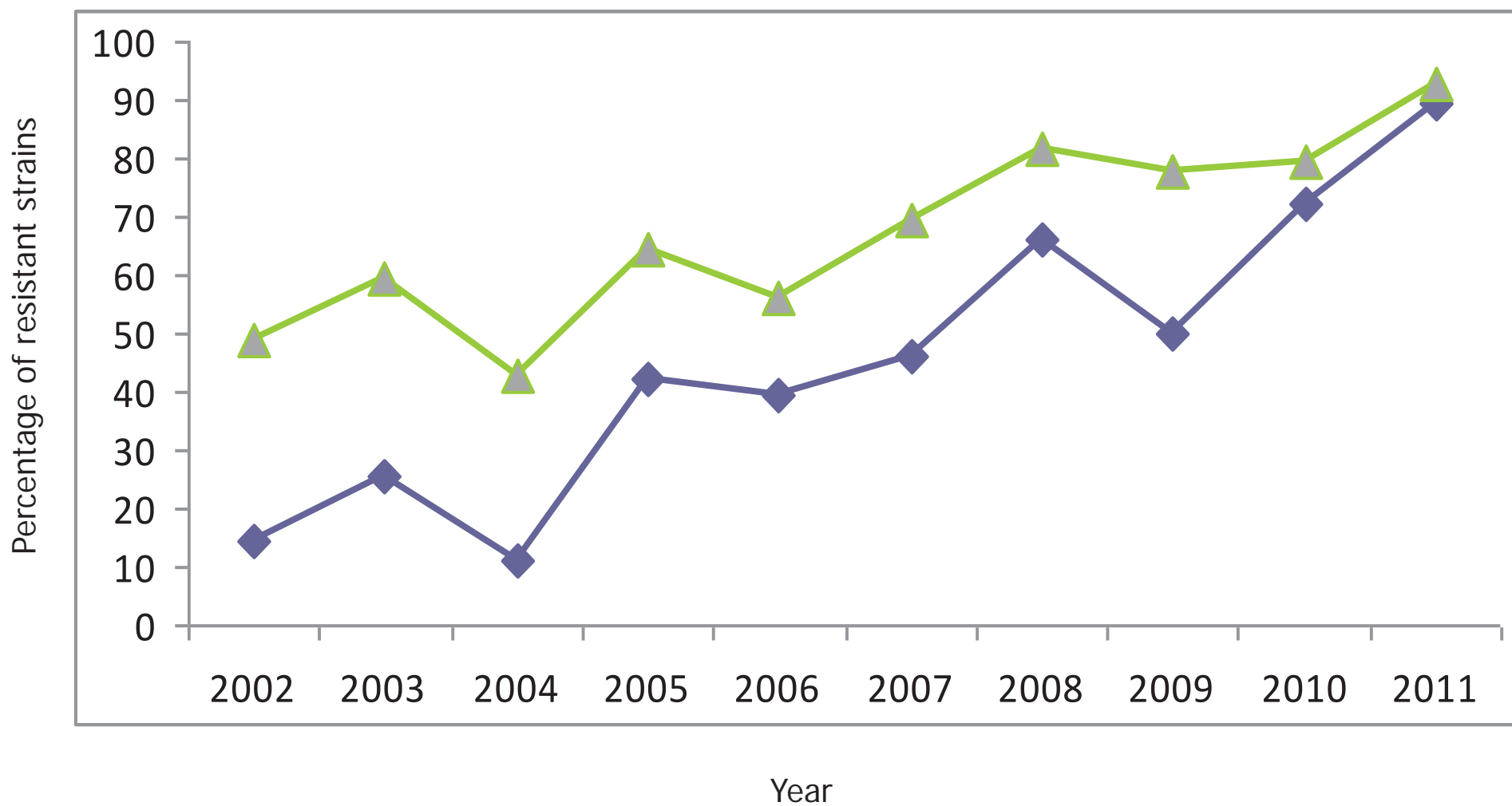


RESULTATI



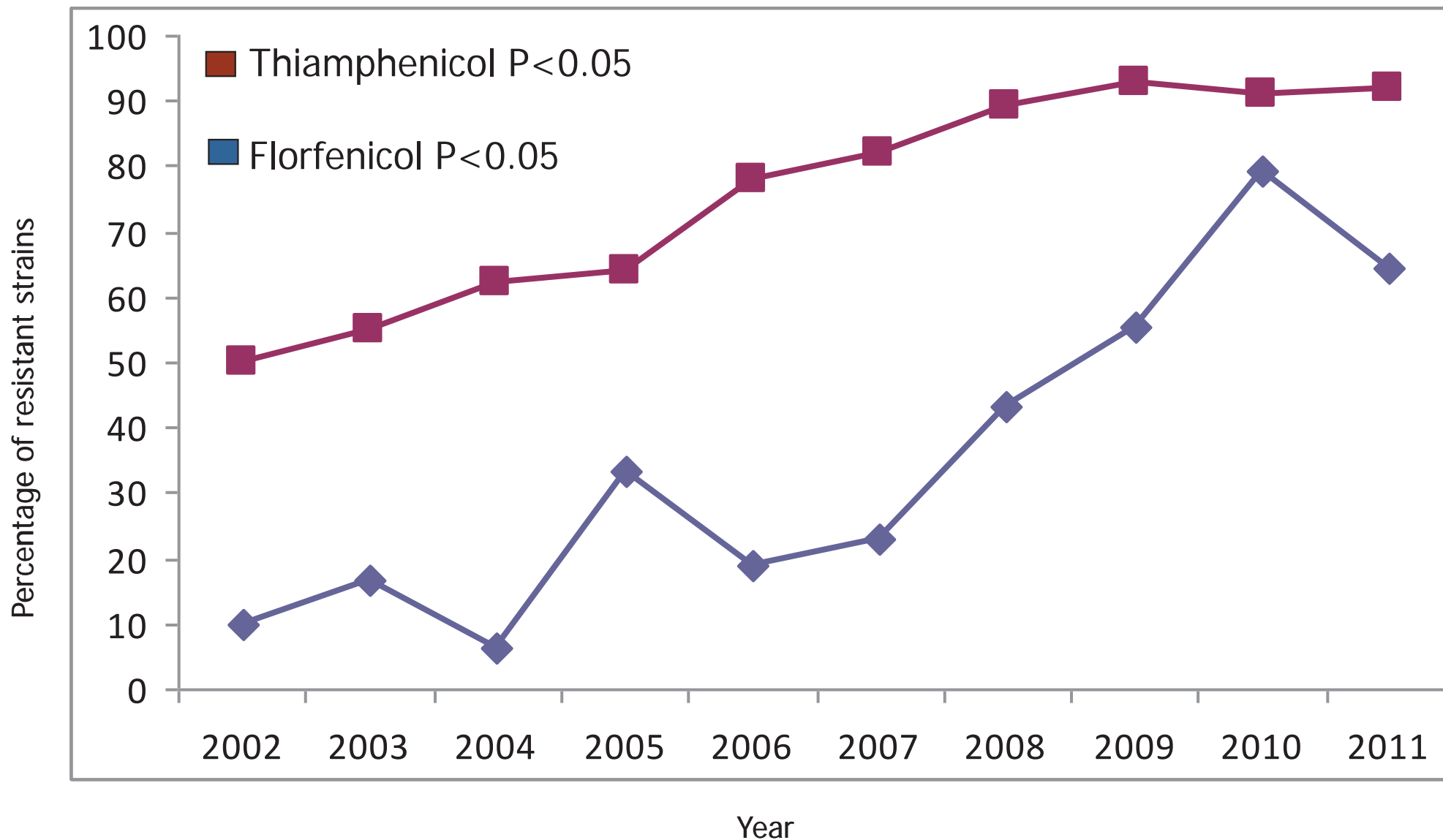
■ Flumequine $P < 0.05$

■ Enrofloxacin $P < 0.05$





RESULTATI



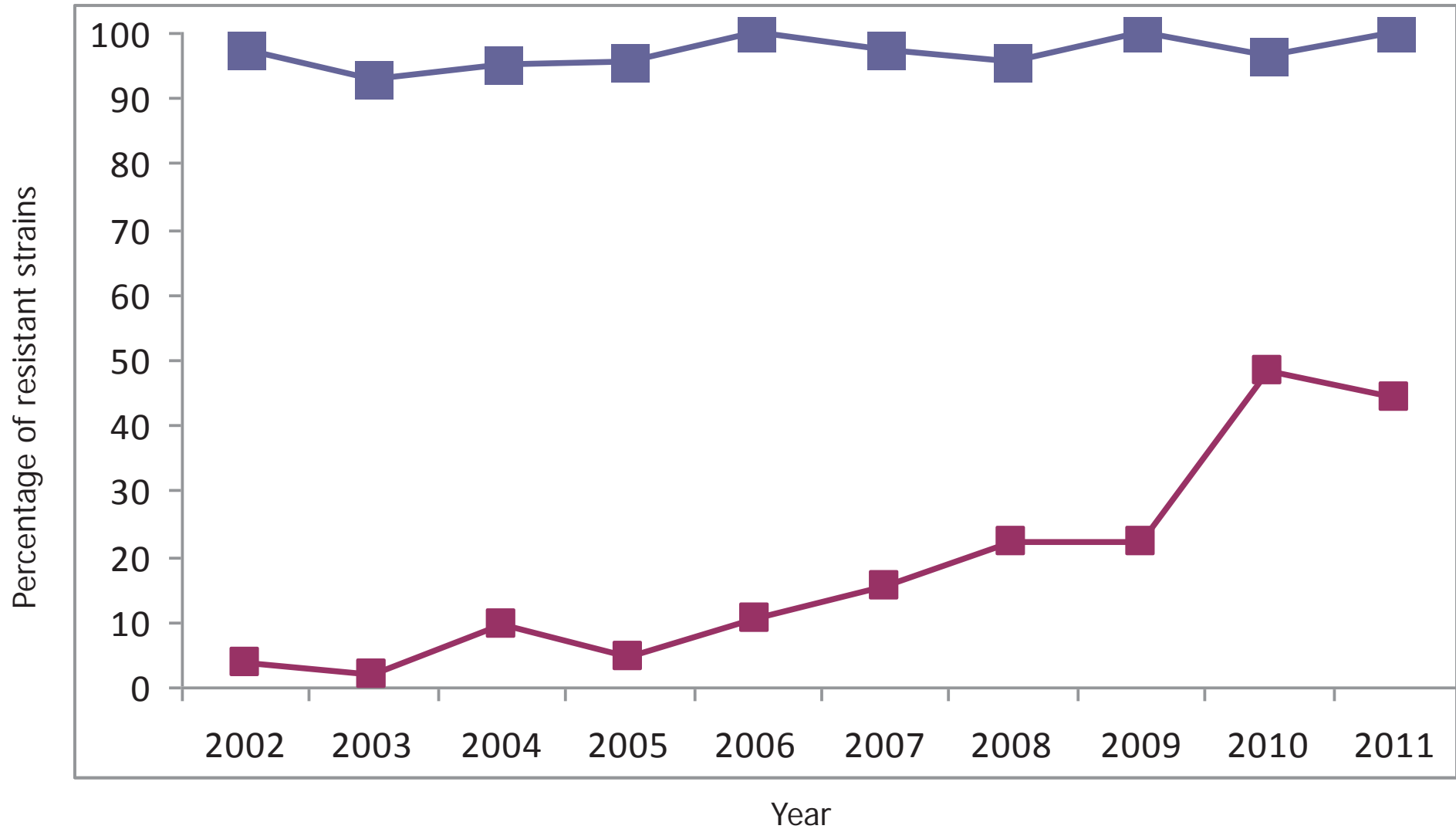


RESULTATI



■ Tetracycline $P > 0.05$

■ Cefquinome $P < 0.05$



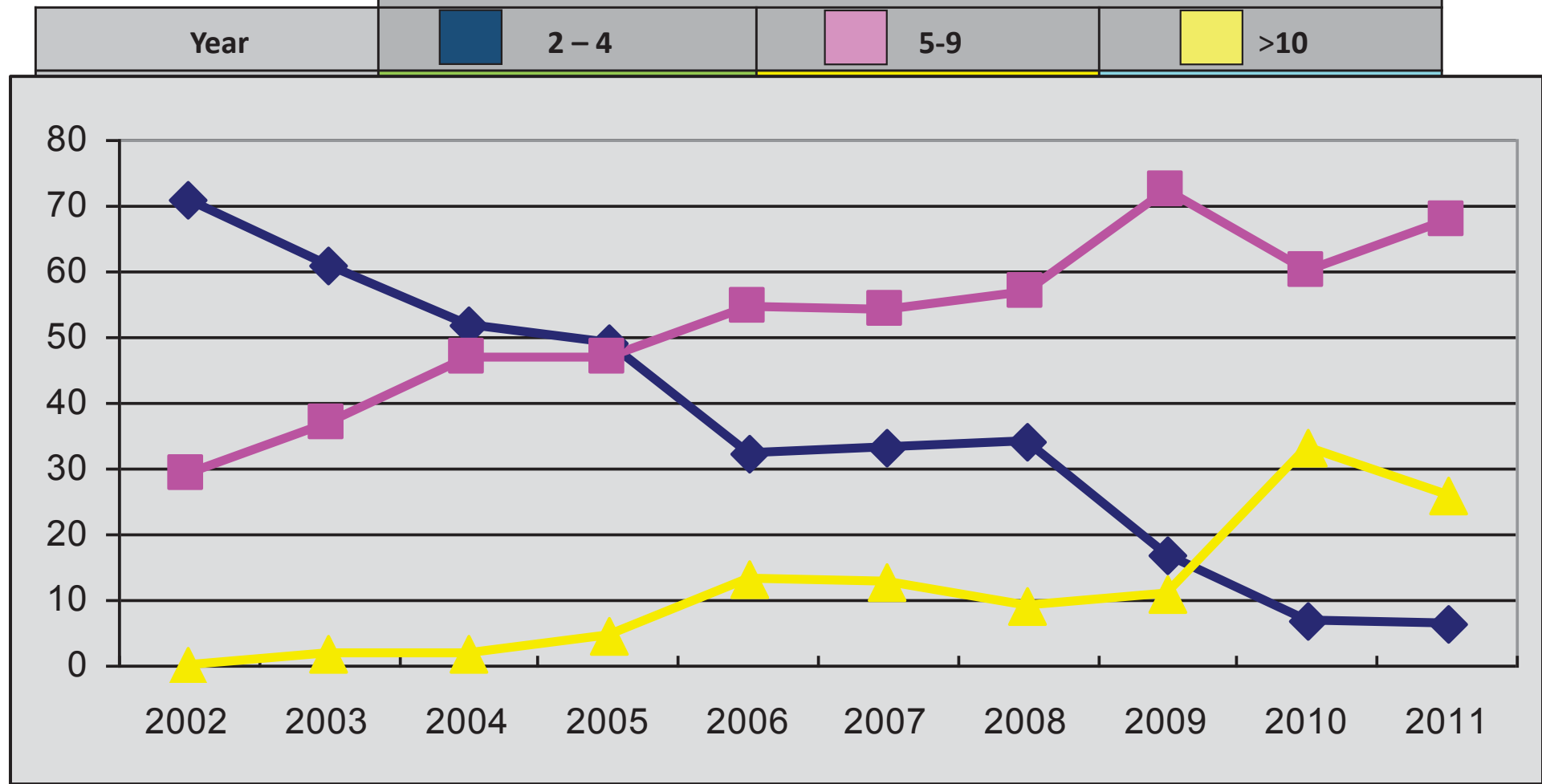


CLASSI DI MULTIRESISTENZA

Year	2 – 4	5-9	>10
2002	70,9%	29,1%	0%
2003	61,1%	37%	1,9%
2004	51,6%	46,8%	1,6%
2005	48,9%	46,7%	4,4%
2006	32,4%	54,4%	13,2%
2007	33,3%	53,9%	12,8%
2008	34,1%	56,8%	9,1%
2009	16,7%	72,2%	11,1%
2010	6,7%	60%	33,3%
2011	6,5%	67,7%	25,8%
Statistical analysis	P	$P < 0.05$	$P < 0.05$
	R ²	0,9601	0,8634
	r	-0,979847	0,929193
			$P < 0.05$
			0,7509
			0,866545



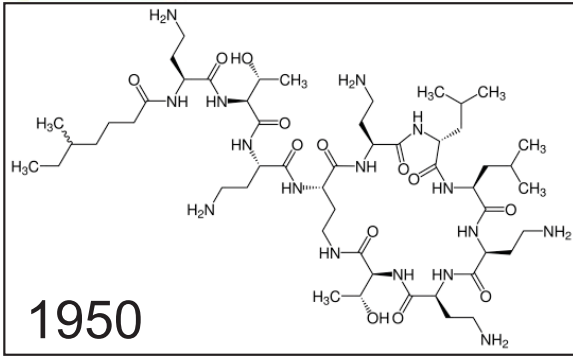
CLASSI DI MULTIRESISTENZA



Statistical analysis	R ² r	2-4	5-9	>10
		0,9601	0,8634	0,7509
		-0,979847	0,929193	0,866545



COLISTINA



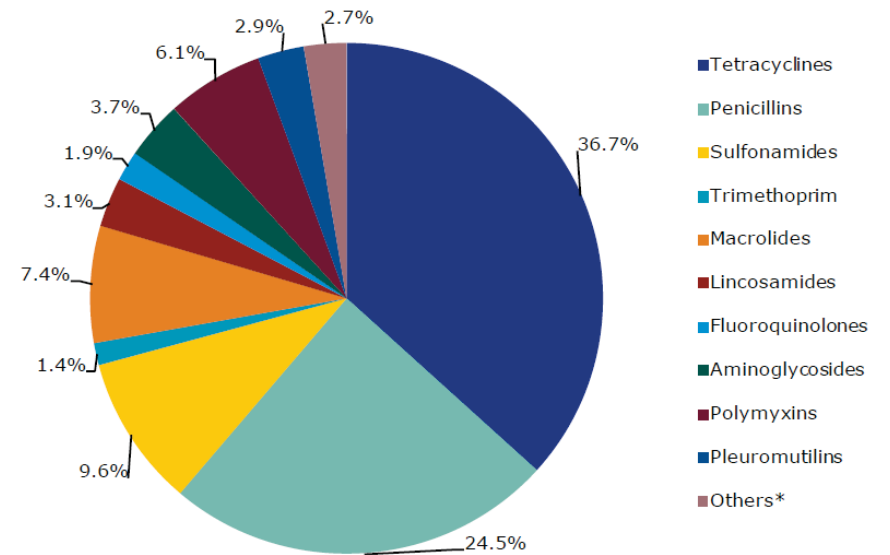
Medicina umana

Medicina veterinaria

Utilizzi e consumi



Fifth ESVAC report



Country	Origin	% of R/ non WT	Reference
France	1	0.5%	Belloc et al., 2008
Sweden	1	0%	SVARM, 2011
Denmark	1	0%	DANMAP, 2009
Belgium	2	9.6%	Boyen et al., 2010
Croatia	2	3%	Habrun B., 2011

Country	Origin	% of R/ non WT	Reference
China	1	33.3%	Lu et al., 2010
Japan	2	35.6%	Harada K., 2005
Vietnam	1	24.4%	Nhung et al., 2016

Country	Origin	% of R/ non WT	Reference
Brazil	2	6.3%	Morales et al., 2012
Brazil	2	28.1%	Costa et al., 2010

1. Suini asintomatici
2. Suini con diarrea



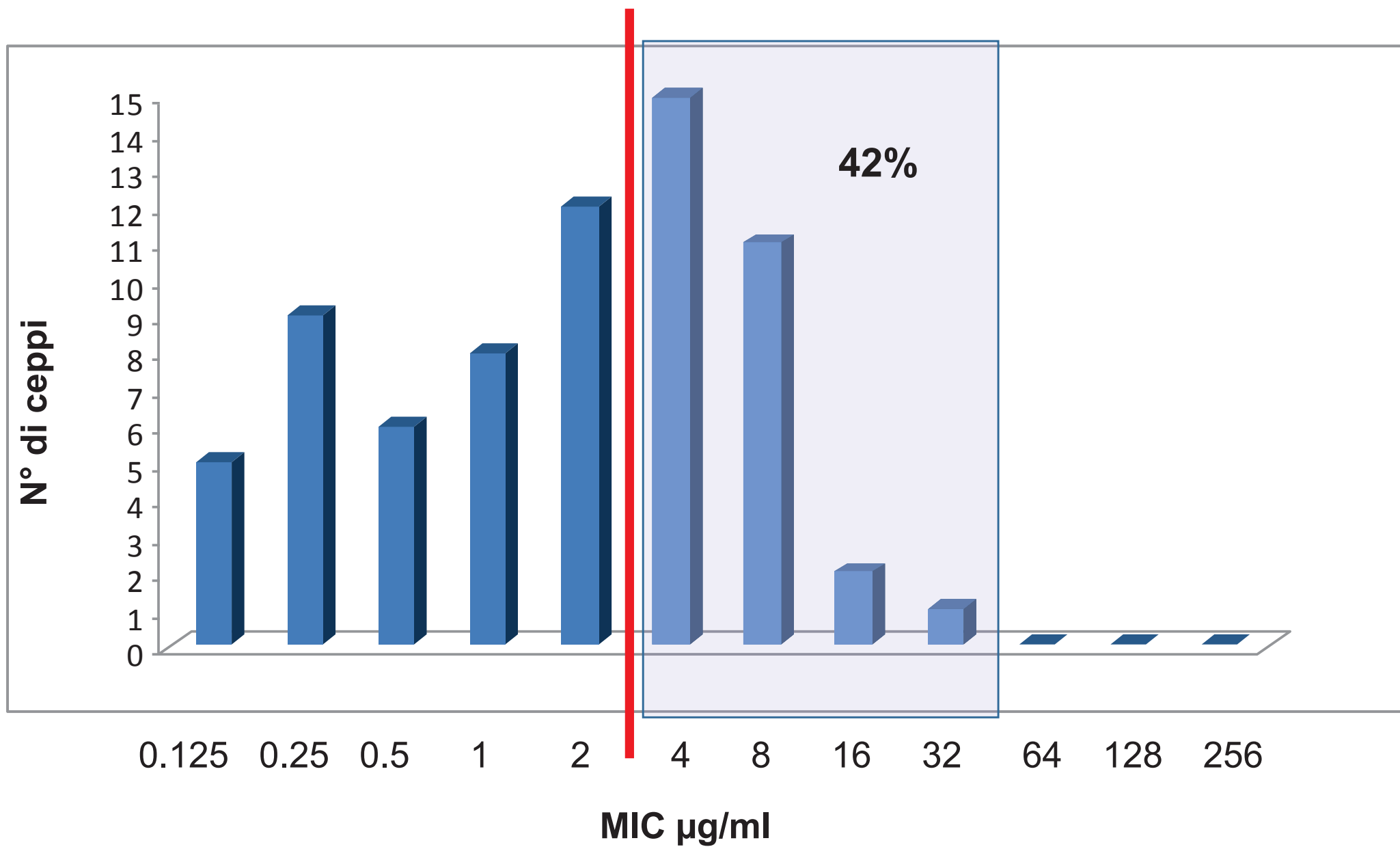
Materiali and metodi

- **69 ceppi** di ETEC isolati nel 2014 da casi di PWD
- **Virotipo** determinato con l'impiego di una multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009)
- **MIC per Colistina** tramite microdiluizione in brodo (CLSI, 2013)
- **Breakpoint clinico ed ECOFF**: MIC >2 µg/ml (EUCAST 2013)





RISULTATI

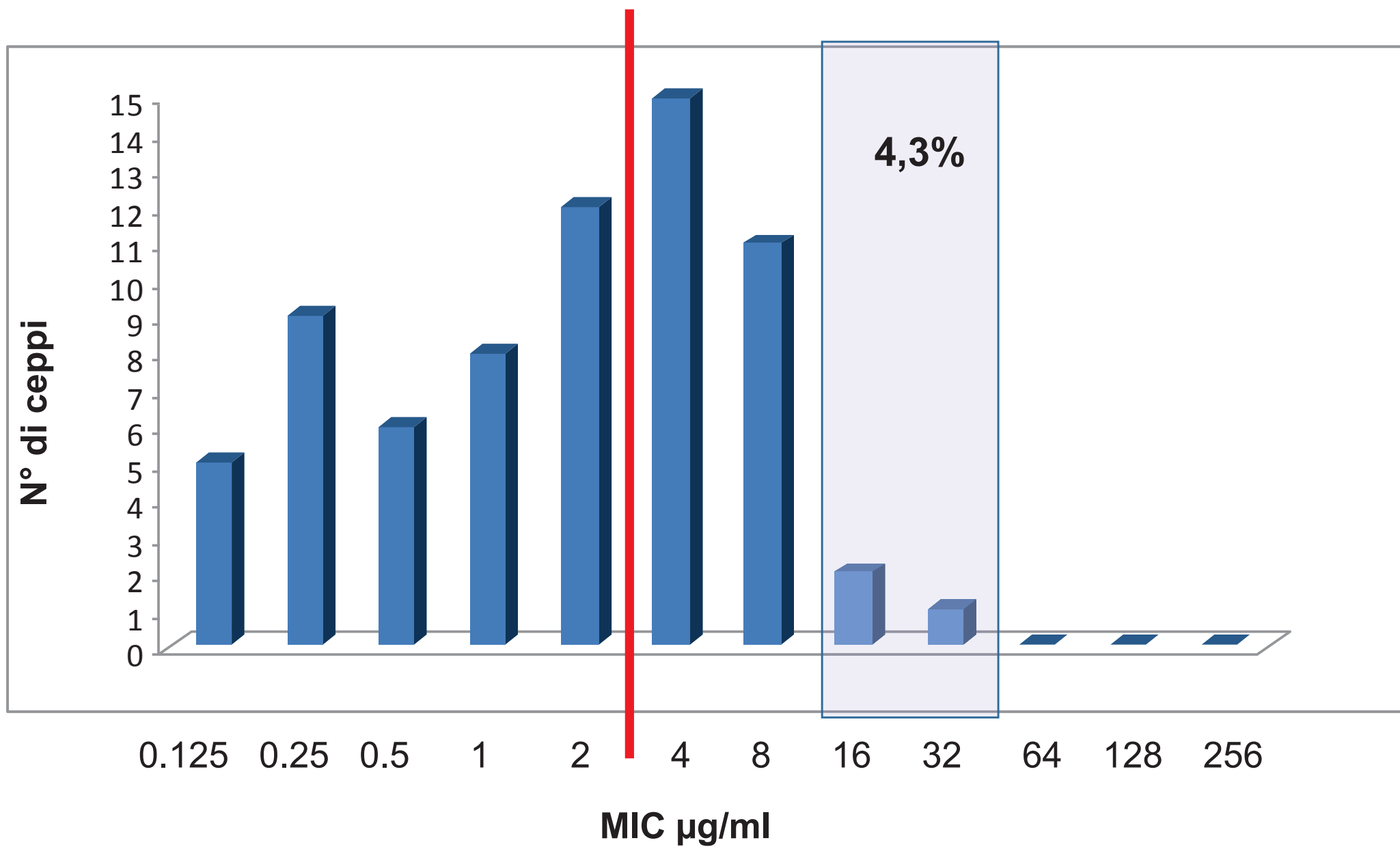




- Elevata % di resistenze: isolati da casi clinici
- Il laboratorio coinvolto frequentemente solo dopo l'insuccesso terapeutico
- **Breakpoint clinici** per *Enterobacteriaceae* sotto continua valutazione
- Burch (2007), ha calcolato che con una concentrazione nel mangime di 66 ppm, la colistina può raggiungere una concentrazione battericida nel digiuno del suino, per ceppi di *E.coli* con **MIC di 8 µg/ml**, ma non di 16 µg/ml.



RISULTATI



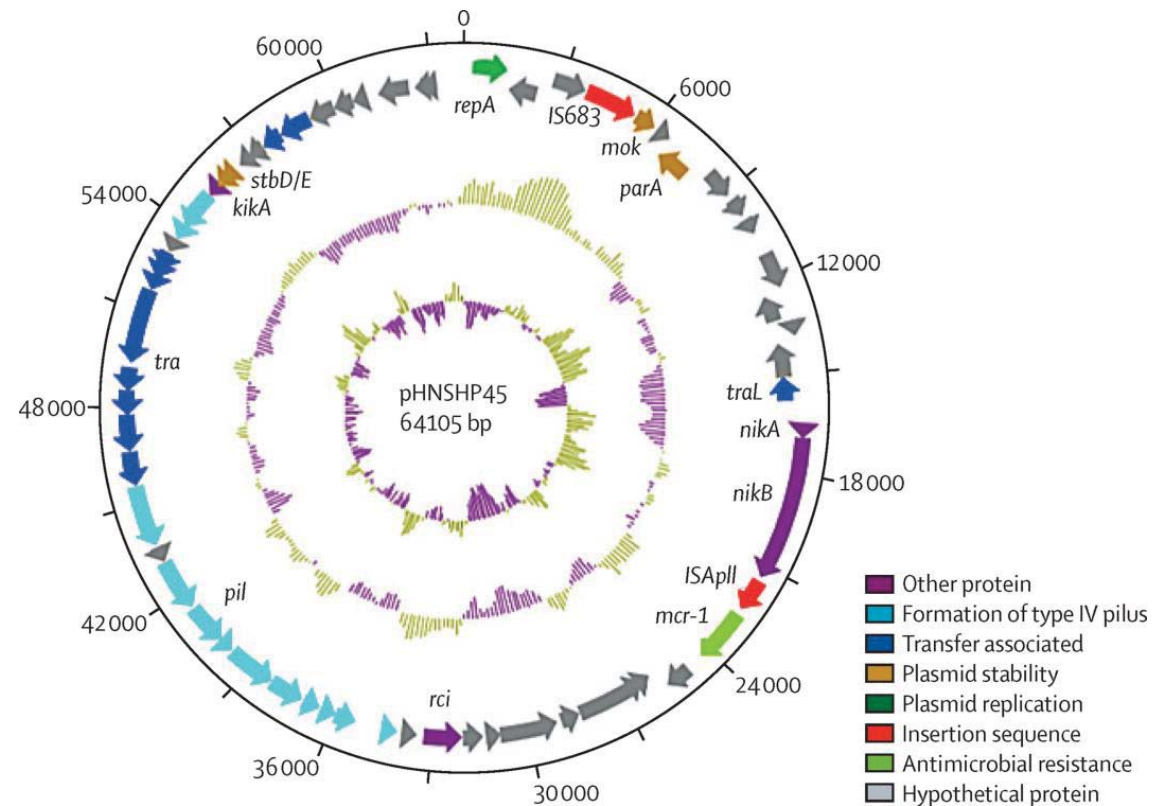
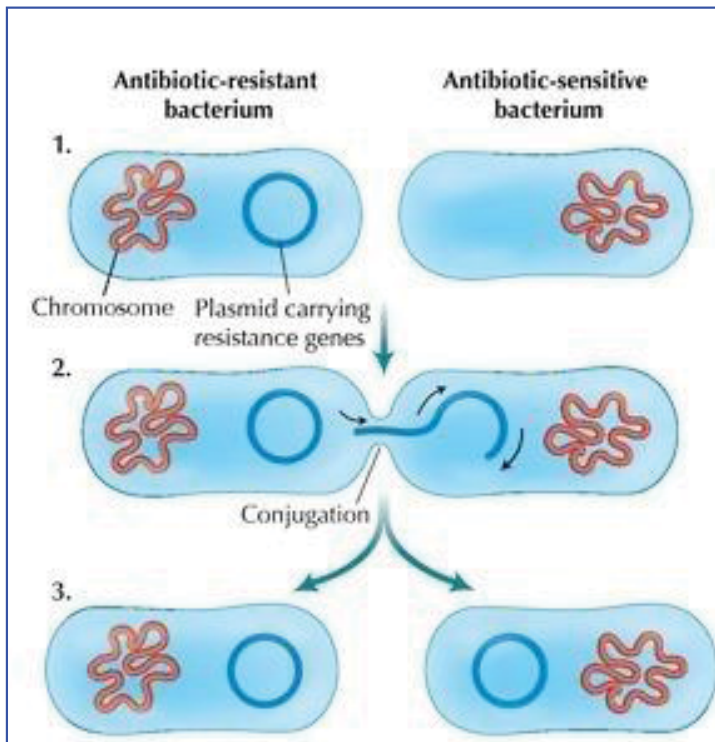


- geni di resistenza
- diffusione della resistenza

Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study

Yi-Yun Liu*, Yang Wang*, Timothy R Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohei Doi, Guobao Tian, Baolei Dong, Xianhui Huang, Lin-Feng Yu, Danxia Gu, Hongwei Ren, Xiaojie Chen, Luchao Lv, Dandan He, Hongwei Zhou, Zisen Liang, Jian-Hua Liu, Jianzhong Shen

The Lancet Infectious Diseases
Volume 16, Issue 2, Pages 161-168 (February 2016)
DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7





MONITORAGGIO GENE *mcr-1*



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc



Detection of plasmid mediated colistin resistance (*MCR-1*) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* is

Alberto Quesada ^{a,*}, María Ugarte-Ruiz ^a,
Diego Florez-Cuadrado ^b, María J. Camacho ^b

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkw093

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published April 18, 2016

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales

Michel Doumith, Gauri Godbole, Philip Ashton, Lesley Larkin, Tim Dallman, Martin Day, Michaela Day, Berit Muller-Pebody, Matthew J. Ellington, Elizabeth de Pinna, Alan P. Johnson, Katie L. Hopkins and Neil Woodford*

Appl. Environ. Microbiol.

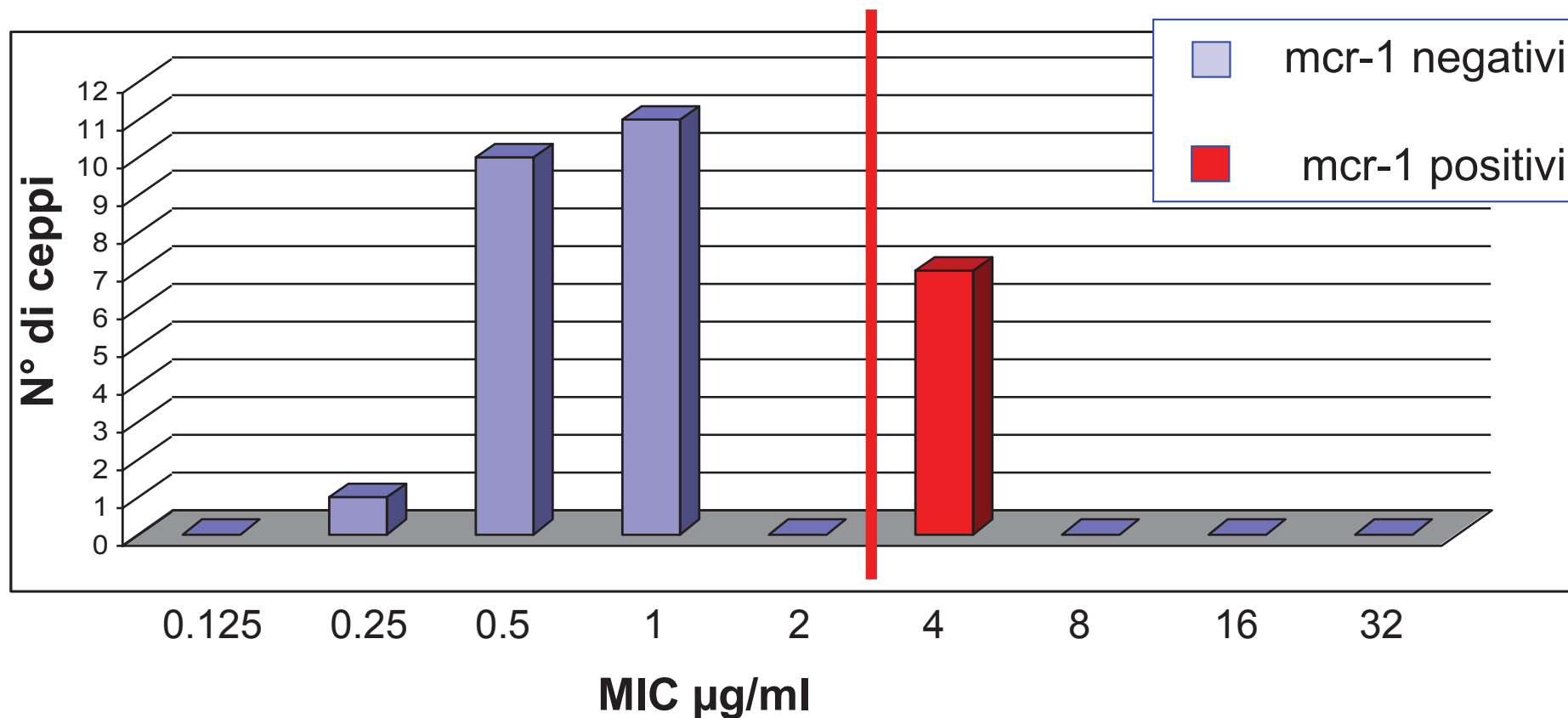
The use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and their association with resistance in commensal *Escherichia coli*

Nhung T. Nguyen^{1*}, Hoa M. Nguyen¹, Cuong V. Nguyen¹, Trung V. Nguyen^{1,2},
Men T. Nguyen³, Hieu Q. Thai³, Mai H. Ho³, Guy Thwaites^{1,4}, Hoa T. Ngo^{1,4},
Stephen Baker^{1,4} and Juan Carrique-Mas^{1,4}



Materiali, metodi e risultati

- 27 ceppi di ETEC – isolamento: 2016
- MIC per **Colistina** con microdiluzione in brodo (CLSI, 2013)
- MIC >2 µg/ml (EUCAST 2013)
- PCR per il gene **mcr-1**



- tutti i ceppi resistenti alla colistina positivi per il gene **mcr-1**



MCR-1 e RIPERCUSSIONI



26 May 2016
EMA/355125/2016
Press Office

European expert group proposes reduction of use in animals of last resort antibiotic colistin to manage risk of resistance

Updated advice is released for public consultation

27 July 2016

EMA/CVMP/CHMP/231573/2016

Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP)

Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)

Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health

- Target per gli stati membri: < 5 mg colistina / PCU
- Italia e Spagna nel 2013: 20-25 mg colistina / PCU
- Implementazione altre strategie. No altre molecole, in particolare CIA.
- No utilizzo combinato con altre sostanze antimicrobiche in prodotti per usop orale



MCR-1 e RIPERCUSSIONI



26 May 2016
EMA/355125/2016
Press Office

European expert group proposes reduction of use in animals of last resort antibiotic colistin to manage risk of resistance

Updated advice is released for public consultation

• ZnO

Azione



Problemi di co-selezione

Inquinamento ambientale

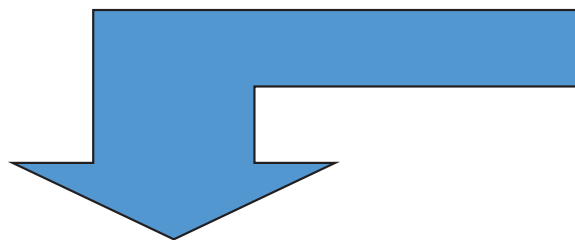
- Target per gli stati membri: < 5 mg colistina / PCU
- Italia e Spagna nel 2013: 20-25 mg colistina / PCU
- Implementazione altre strategie. No altre molecole, in particolare CIA.
- No utilizzo combinato con altre sostanze antimicrobiche in prodotti per usop orale



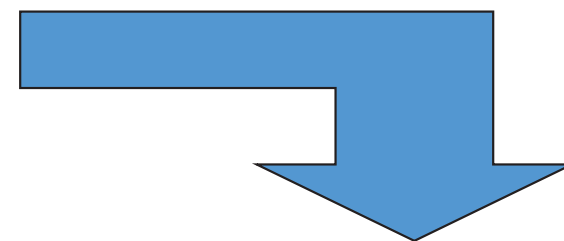
CONCLUSIONE



DIAGNOSI

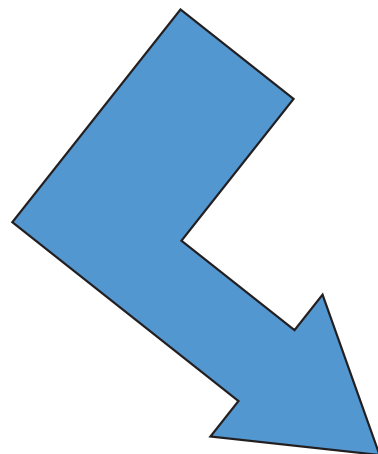


Test di
sensibilità

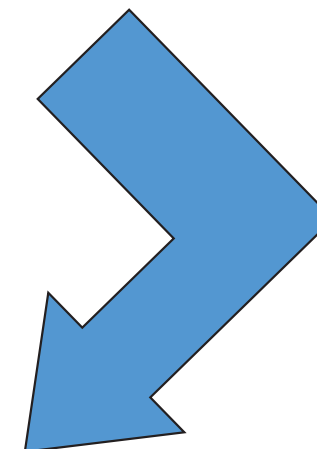


Diagnosi di malattia
vs presenza del
patogeno

**GESTIONE DELLA
PATOLOGIA ENTERICA
SOTTOSCRIFA E NEL
POST SVEZZAMENTO**



Utilizzo dell'antibiotico terapia
e fenomeni di resistenza
Limitazione dell'uso di alcune
molecole



**Necessità di misure di controllo basate
sulla gestione e su metodi alternativi**



Grazie per l'attenzione!