

SPONDILITE DA *ENTEROCOCCUS CECORUM* NEL POLLO DA CARNE

Bano L.¹, Bonci M.¹, Drigo I.¹, Ferro T.¹, Vascellari M.², Cesca A.³, Agnoletti F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di istopatologia

³Medico veterinario libero professionista

ABSTRACT - *Enterococcus cecorum* spondylitis in broiler chickens.

The present paper reports an outbreak of spondylitis caused by *Enterococcus cecorum* in a flock of 120,000 broiler chickens located in Veneto region. The birds submitted to our laboratory were six weeks old and showed a “kinky-back”-like syndrome, characterized by lameness and paresis, which affected 10% of the birds of the flock since about the age of 30 days. Three of the examined chickens showed chronic inflammatory lesions on the ventral side of the spine at T4-T5 level. The bacteriological examination of the vertebral lesions yielded a pure culture of catalase negative, Gram positive cocci identified as *Enterococcus cecorum*. *In vitro* antimicrobial susceptibility of the isolated strains was tested and resistance to tetracycline was detected. Possible hypothesis on the pathogenesis of the described infection are also suggested.

Key words: broiler, spondylitis, *Enterococcus cecorum*.

Introduzione

I batteri appartenenti al genere *Enterococcus*, in passato raggruppati nel sierogruppo di Lancefield “D” del genere *Streptococcus*, sono dei cocchi Gram-positivi disposti singolarmente o a coppie, catalasi negativi, caratterizzati dalla comune capacità d'idrolizzare l'esculina. Sono ampiamente distribuiti in natura e possono essere rinvenuti nel suolo, nell'acqua, nei vegetali, e nel tubo gastroenterico di uomo e animali, inclusi uccelli ed insetti (Teixeira and Facklam, 2003).

In patologia aviaria le malattie attribuite ad enterococchi sono infrequenti e solitamente riguardano infezioni embrionali con mortalità in uovo o infezioni del residuo del sacco vitellino che avvengono nel primo giorno di vita e che hanno alla base una cattiva gestione di queste importanti fasi della vita del pulcino (cosiddetta “poor chick quality”). Sporadicamente sono state segnalate blefaro-congiuntiviti, celluliti, endocarditi, artriti ed encefalomalacia associate a varie specie di enterococchi. Nel pollo le specie più frequentemente isolate in corso di malattia sono *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus faecalis* (Smyth and McNamee, 2008). Negli ultimi anni sono aumentate in modo preoccupante nel pollo da carne, le segnalazioni di osteomieliti a carico di ossa lunghe e corpi vertebrali, associate alla presenza di *Enterococcus cecorum*: uno dei microrganismi numericamente più rappresentati nel tubo gastroenterico del pollo (Charlton *et al.*, 2009; De Herdt *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2002). Sino al 2008 esisteva un'unica segnalazione di tale patologia, osservata in Gran Bretagna in gruppi di polli da carne di 4-5 settimane, in cui *E. cecorum* era stato isolato sia da osteomieliti delle vertebre toraciche che da lesioni di osteonecrosi a carico dell'epifisi femorale prossimale, definite comunemente “necrosi della testa del femore” (Wood *et al.*, 2002). Ma studi retrospettivi condotti da Charlton (2009) e De Herdt (2009) hanno dimostrato che la sintomatologia cosiddetta “kinky-back” (McMullin P., 2004) associata a spondilite da *E. cecorum*, era in costante aumento già a partire dal 2006.

Di seguito vengono riportati i rilievi clinici, anatomopatologici, istologici e batteriologici raccolti durante un focolaio di spondilite da *E. cecorum* del broiler osservato in Italia.

Materiali e metodi

Dati anamnestici

A fine gennaio 2010, in 6 capannoni di un allevamento di 120.000 broiler Ross 708 di 25 giorni, è stata osservata una sintomatologia caratterizzata da difficoltà di deambulazione, decubito prolungato sui tarsi e sul coccige e difformità d'accrescimento del gruppo. I soggetti colpiti erano circa il 10% dell'effettivo e alcuni di questi presentavano tumefazioni a carico delle articolazioni tibiotarsiche e utilizzavano le ali per aiutarsi nella deambulazione. Tutti gli animali allevati nei 6 capannoni dove si era manifestato il problema, facevano parte di un'unica partita di pulcini mentre negli altri 6 capannoni erano ospitati soggetti della stessa età provenienti da una differente schiusa e non veniva riferita alcuna problematica sanitaria. All'arrivo i pulcini erano stati trattati con enrofloxacin per problemi di onfaliti settiche e, al momento della comparsa della sintomatologia motoria, avevano subito un primo trattamento con amoxicillina, seguito da un trattamento con doxiciclina, senza osservare alcun miglioramento.

Esame anatomopatologico

L'esame anatomopatologico è stato eseguito su 5 soggetti di 44 giorni con la sintomatologia sopradescritta e su un soggetto che manifestava evidente ritardo nell'accrescimento. Prima di essere sacrificati da ciascun animale è stato eseguito un prelievo di sangue per indagini sierologiche.

Accertamenti batteriologici

Dalle lesioni a carico della colonna vertebrale, delle articolazioni tibiotarsiche e dalla milza è stato eseguito l'esame batteriologico utilizzando come terreni di coltura agar sangue, addizionato con esculina, ed EMB (Eosin Methylene Blue). I terreni sono stati incubati a 37 °C in aerobiosi ed ispezionati a 24, 48 e 72 ore.

Inizialmente gli isolati batterici sono stati sottoposti a colorazione di Gram, al test della catalasi ed è stata verificata l'idrolisi dell'esculina. Tutte le colture batteriche riconducibili ad *Enterococcus* spp., sono state sottoposte ad identificazione mediante galleria API rapid ID 32 STREP V3.0 (Bio Merieux). La farmacosenibilità dei ceppi batterici identificati è stata saggiata secondo il metodo della diffusione in agar nei confronti di penicillina, ampicillina, oxacillina, amoxicillina più ac. clavulanico, cefalotina, cefquinome, eritromicina, tilosina, spiramicina, clindamicina, tetraciclina, enrofloxacin, sulfamethoxazolo più trimethoprim, tiamulina (NCCLS, 2002). Il materiale patologico prelevato da lesioni ossee ed articolari è stato anche esaminato mediante PCR specifica per *Mycoplasma synoviae* (Marois *et al.*, 2000).

Accertamenti istopatologici

Nel corso dell'esame anatomopatologico, sono stati prelevati campioni di tessuto osseo vertebrale e splenico, fissati in formalina tamponata al 10% e routinariamente processati per l'allestimento del preparato istologico. Dopo inclusione in paraffina, sono state allestite sezioni di 4 µm, colorate con ematossilina ed eosina e osservate al microscopio ottico. Su ulteriori sezioni è stata inoltre eseguita la colorazione istochimica di Gram.

Ulteriori accertamenti collaterali

Dal siero sono stati ricercati anticorpi verso *Mycoplasma synoviae*, il virus dell'anemia infettiva del pollo e del sierotipo M41 del virus della bronchite infettiva mediante siero agglutinazione rapida, ELISA e inibizione dell'emoagglutinazione, rispettivamente. Inoltre è stato eseguito l'esame parassitologico tramite osservazione microscopica diretta di raschiati della mucosa intestinale eseguiti in vari distretti.

Risultati

Due dei 5 soggetti con difficoltà di deambulazione presentavano artrite fibrinosa a livello di articolazione tibiotarsica mentre negli altri 3 si evidenziavano delle protuberanze fibro-cartilaginee con centro necrotico a carico della porzione ventrale del rachide, tra T4 e T5 (figura 1). Le lesioni erano meglio ispezionabili dopo asportazione di reni e polmoni. Istologicamente si apprezzava un processo purulento-necrotico a carico del tessuto osseo associato alla presenza di aggregati batterici e una iperplasia splenica. All'esame batteriologico condotto sul materiale patologico prelevato dalle lesioni vertebrali si apprezzava la crescita di colonie tonde con margini regolari grigiastre, esulina positive e catalasi negative, maggiormente evidenti dopo 48 ore d'incubazione su agar sangue mentre su terreno EMB le colonie erano scarsamente visibili anche dopo 72 ore. Microscopicamente le colture batteriche apparivano costituite da cocci Gram-positivi leggermente allungati disposti singolarmente o a coppie identificati biochimicamente come *Enterococcus cecorum*. A livello articolare è stato isolato uno streptococco esulina negativo, non identificabile mediante i kit biochimici utilizzati. I ceppi di *E. cecorum* isolati sono risultati sensibili a penicillina, ampicillina, amoxicillina più ac. clavulanic, cefalotina, cefquinome, enrofloxacin, sulfamethoxazolo più trimethoprim e tiamulina. L'esame batteriologico della milza ha dato esito negativo. Il soggetto di scarto presentava aerosacculite e pericardite fibrinosa associate alla presenza di *E. coli*. La PCR per *M. synoviae* è risultata negativa sia per le lesioni vertebrali che per quelle tibiotarsiche mentre la sierologia per *M. synoviae* ha dato esito positivo in 2 soggetti, di cui uno con artrite e l'altro con spondilite. Sierologicamente gli animali esaminati sono risultati negativi per anemia e positivi, con titoli vaccinali, alla bronchite infettiva. Tre soggetti con lievi lesioni emorragiche puntiformi sulla mucosa duodenale, sono risultati positivi per coccidi in carica medio-bassa.

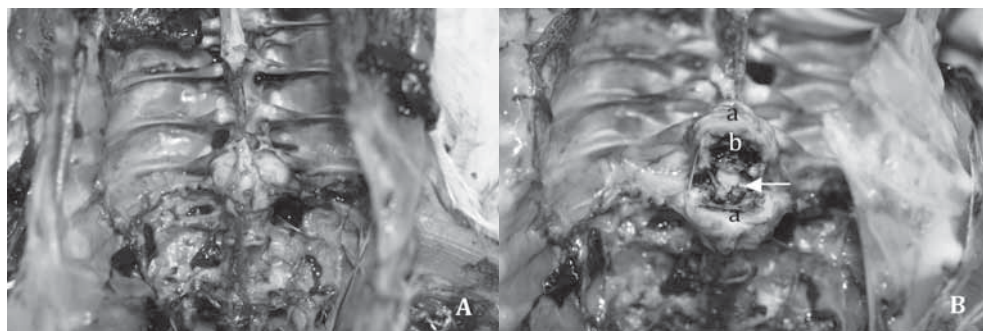


Figura 1. A: protuberanza fibro-cartilaginea tra T4 e T5. B: sezione della lesione vertebrale in cui sono distinguibili la capsula fibro-cartilaginea (a), il materiale osteonecrotico al centro della lesione (b) e il midollo spinale (freccia).

Discussione e conclusioni

Nell'allevamento del pollo da carne le lesioni a carico dell'apparato muscolo-scheletrico sono economicamente penalizzanti in quanto si ripercuotono sulle performance zootecniche finali. Nell'ultimo anno si è assistito in USA e Belgio ad un aumento delle segnalazioni di problemi di deambulazione legati a osteomieliti vertebrali dalle quali è stato isolato ripetutamente *E. cecorum* (Charlton *et al.*, 2009; De Herdt *et al.*, 2009). Il confronto tra l'episodio descritto negli USA da Charlton (2009) verificatosi in estate e il presente caso clinico, osservato in inverno, porta ad escludere un'influenza della stagionalità sulla comparsa della spondilite da *E. cecorum*. In entrambi i casi è stata osservata una comune origine della partita nella quale si è manifestato il problema, e questo fa ritenere che possa esservi una predisposizione genetica alla malattia o, in alternativa, che alla base vi sia una cattiva gestione della fase d'incubazione e schiusa del gruppo colpito (poor chick quality). Nonostante restino ancora da chiarire molti aspetti legati alla patogenesi, sostanzialmente possono essere formulate tre ipotesi per tentare di spiegare la localizzazione vertebrale di *E. cecorum*. La prima è che tale enterococco abbia colonizzato il rachide a partire da infezioni del sacco vitellino avvenute durante la vita embrionale o nel periodo di schiusa. Tale infezione vertebrale avrebbe concorso all'indebolimento delle strutture ossee, rendendole inadatte a sostenere il peso delle masse muscolari sviluppatesi successivamente e portando alla sintomatologia clinica. A sostegno di tale ipotesi vi sarebbero sia il carattere di cronicità delle lesioni vertebrali testimoniato dalla proliferazione di tessuto fibro-cartilagineo che la comune origine della partita. La seconda ipotesi è che il microrganismo possa penetrare per via ascendente da lesioni podali. Questo spiegherebbe perché alcuni autori hanno isolato il microrganismo da artriti a carico delle articolazioni tibiotarsiche o a livello di testa del femore (Wood *et al.*, 2002; Charlton *et al.*, 2009; De Herdt *et al.*, 2009), ma non chiarirebbe il perché della sua localizzazione in alcuni distretti della colonna vertebrale. La terza ipotesi è che *E. cecorum* entri nel torrente circolatorio a partire dal tubo gastroenterico e che si localizzi a livello vertebrale in seguito ad una più intensa vascolarizzazione di un distretto che, a causa di una sollecitazione meccanica (es. kinky-back), è già interessato da fenomeni infiammatori per i quali si sospetta una predisposizione genetica (McMullin, 2004). Tale ipotesi spiegherebbe la localizzazione delle lesioni in corrispondenza di articolazioni intervertebrali che consentono movimenti di flessione del rachide pollo (come tra T4 e T5) e non a livello di altri corpi vertebrali tra loro sinostosiati. In questo distretto *E. cecorum* causerebbe la lisi del tessuto osseo: capacità riconosciuta agli enterococchi anche in medicina umana (Tarr *et al.*, 2004).

L'inefficacia dei trattamenti potrebbe essere dovuta da un lato alla resistenza di *E. cecorum* alla tetraciclina (verificata *in vitro*) e dall'altro alla particolare localizzazione del microrganismo, difficilmente raggiungibile dal farmaco, soprattutto se somministrato per via orale. In medicina umana le osteomieliti settiche vengono infatti trattate con beta-lattamici somministrati per via endovenosa in infusione continua per tempi prolungati (Tarr *et al.*, 2004), pratica improponibile nell'allevamento avicolo.

Bibliografia

1. Charlton B. R., Cooper G. L., Stoute S., Bickford A. A., Senties-Cue C. 2009. *G. Enterococcus cecorum* osteomyelitis. Atti LVIII Western poultry Disease Conference, 23-25 Marzo, Sacramento, California. Pp. 98-99.
2. De Herdt P., Defoort P., Van Steelant J., Swam H., Tanghe L., Van Goethem S., Vanrobaeys M. 2009. *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. Atti del XVI World Veterinary Poultry Association Congress, 8-12 Novembre, Marrakesh, Marocco. Pag. 173.
3. Gong J., Forster R. J., Yu H., Chambers J. R., Wheatcroft R., Sabour P. M., Chen S. 2002. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. FEMS Microbiology Ecology 41:171-179.
4. Marois C., Oufour-Gesbert F., Kempf I. 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, 73:311-318.
5. McMullin P. 2004. Spondylolisthesis, kinky-back. In: a pocket guide to poultry health and disease. McMullin.. Ed. 5M Enterprises. Pp. 193-194.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard, 2nd edition. NCCLS document, M31-A2. Vol.22, No.6. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
7. Smyth J. A., McNamee P. T. 2008. Staphylococci, streptococci and enterococci. In: Poultry Diseases, 6th Edition. Pattison M., McMullin P. F., Bradbury J. M., Alexander D. J. Ed. Saunders, Elsevier. Pp. 191-199.
8. Tarr P. E., Sakoulas G., Ganesan A., Smith M. A., Lucey D. R. 2004. Hematogenous enterococcal vertebral osteomyelitis: report of 2 cases and review of the literature. Journal of Infection 48: 354-362.
9. Teixeira L. M., Facklam R. R. 2003. *Enterococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology 8th Edition. Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C. Ed. ASM Press, Washington DC, USA. Pp 422-433.
10. Wood A. M., MacKenzie G., McGillveray N. C., Brown L. 2002. Isolation of *Enterococcus cecorum* from bone lesions in broiler chickens. The Veterinary Record, 150:27.