

IMPORTANZA DELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO NEI CASI DI ZOPPIA DEL POLLO E DEL TACCHINO

Giovanardi D.¹, Pesente P.¹, Rossi G.¹, Lupini C.², Morandini E.³, Catelli E.² e Ortali G.³

¹ *Laboratorio Tre Valli. San Michele Extra (VR), Italia*

² *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Veterinaria, Università di Bologna, Italia*

³ *Agricola Tre Valli. San Martino Buon Albergo (VR), Italia*

Riassunto

L'utilizzo degli strumenti di laboratorio, come descritto in questi tre casi clinici, è di fondamentale importanza per l'inquadramento diagnostico della zoppia nel pollo e nel tacchino.

Il primo caso clinico (A) si è presentato in un allevamento di polli da carne in cui, dall'età di due settimane, una percentuale elevata di soggetti esibiva zoppia monolaterale che non rispondeva a trattamento con vitamina D e calcio. Gli animali mostravano grave discondroplasia tibiale, osteomielite e fragilità ossea. Dalle analisi batteriologiche e biomolecolari si dimostrava che l'agente causale della osteomielite era *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. La sua scarsa sensibilità agli antibiotici ha reso difficile ma non impossibile il successo terapeutico con amoxicillina. È la prima segnalazione in Italia della presenza di questo batterio nel pollo.

Il secondo caso (B) ha coinvolto un allevamento di tacchini da carne maschi. Gli episodi di zoppia, iniziati alla decima settimana di età, costringevano gli animali a non deambulare correttamente diventando cachettici. Le lesioni comprendevano osteomielite nella testa del femore con artrite purulenta nella articolazione coxofemorale ed alla corrispondente tibiotarsometatarsale. L'isolamento ripetuto in sede di lesione di *Escherichia coli* sierotipo O78 confermava il suo elevato tropismo per le articolazioni ed il midollo osseo. Tutti gli *E. coli* O78 isolati sono APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) con una origine clonale diversa da quelli presenti negli organi setticemici. Trattamenti antibiotici mirati o di massa basati sull'antibiogramma sono stati in grado di prevenire nuovi casi o ridurre la gravità di quelli già esistenti.

Il terzo caso (C) è stato osservato in un allevamento di tacchini da carne maschi. Gli animali, dall'età di 80 giorni, hanno iniziato a presentare difficoltà di deambulazione. La lesione più comunemente evidenziata era una infiltrazione di essudato lattiginoso non purulento tra i fasci dei muscoli flessori delle dita e i tendini che poco interessava l'articolazione tibiotarsometatarsale. *Ornithobacterium rhinotracheale* è stato isolato con difficoltà dal liquido patologico di un tacchino ma la sua presenza, con PCR, dimostrata da più soggetti.

Introduzione

Gli episodi di zoppia negli allevamenti avicoli intensivi sono da ritenersi causa attuale ed importante dello scarso rendimento zootecnico degli animali. Le cause di tali eventi sono da ricondursi spesso a carenza di macro e microelementi

tra cui calcio, fosforo, manganese e di vitamina D oppure ad infezioni virali da reovirus. L'eziologia batterica di questa manifestazione clinica è da tempo dimostrata, infatti numerosi microrganismi sono stati isolati in sede di lesione tra cui: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus cecorum*, *Riemerella anatipestifer* e *Mycoplasma synoviae* (1,4,9). *Streptococcus gallolyticum*, precedentemente classificato come *Streptococcus bovis* tipo 1, è considerato essere un commensale della flora batterica intestinale. Esistono alcune segnalazioni di focolai di setticemia nel pollo anche in presenza di artrite e osteomielite (3,8).

Materiale e Metodi

Allevamenti. L'allevamento di polli da carne (A) era costituito da numero di animali 16400 maschi e 5800 femmine. I conferimenti di animali zoppicanti presso il Laboratorio sono stati due: alla terza e sesta settimana di vita.

L'allevamento di tacchini (B) era costituito da 4500 soggetti maschi che, precedentemente ai casi di zoppia, iniziati intorno alla 10° settimana, avevano conosciuto qualche lieve episodio di colissetticemia. Sono stati analizzati soggetti della 12° e 13° settimana di vita.

Nell'altro allevamento di tacchini (C) erano presenti circa 28000 maschi che, come nel caso precedente, avevano presentato sintomi clinici e lesioni di colissetticemia alla 10° settimana. Successivamente, alla 12° settimana, su una percentuale elevata di soggetti, si evidenziava zoppia con scadimento generale degli animali. Alcuni di essi sono stati inviati al Laboratorio.

Iter diagnostico comune. L'iter di indagine diagnostico, per tutti i casi clinici, ha compreso la ricerca batteriologica dalle articolazioni colpite, dal midollo osseo, dalla testa del femore e dai visceri interessati da lesione nei casi di setticemia. A tale scopo, tamponi od organi sono stati inoculati su agar sangue (5 % sangue di montone) e su Eosin Methylene Blue agar (E.M.B.) (OXOID, Basingstoke, UK) ed incubati a 37 °C per 24 - 48 ore in aerobiosi. La crescita batterica sui terreni è stata valutata e successivamente i batteri sono stati tipizzati e la valutati per la loro antibiotico-sensibilità con il metodo Kirby-Bauer (colistina, gentamicina, apramicina, amoxicillina, ampicillina, aminosidina, trimethoprim e sulfamidico, enrofloxacin e ossitettraciclina).

Iter diagnostico caso clinico A. Il ceppo batterico, riferibile a *Streptococcus*, è stato sottoposto a tipizzazione biochimica con Rapid ID 32 STREP (Biomèrieux, Francia) e a sequenziamento del 16 S e 23 S DNA ribosomiale.

Iter diagnostico caso clinico B. I diversi ceppi di *Escherichia coli* (*E. coli*) sono stati tipizzati biochimicamente con Microbact GN12/A (OXOID) e sierologicamente con antisieri O1, O2, O78 (VLA, Weybrige, UK). Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca dei geni di virulenza *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*, *papC* mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) e analizzati per similarità genomica utilizzando la tecnica RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) comparandoli anche ad altri ceppi di *E. coli* isolati precedentemente in corso di setticemia (5,6,7). Tamponi tracheali, cloacali e milze di tacchini, prelevati settimanalmente, sono stati sottoposti ad analisi PCR per la ricerca del Metapneumovirus Aviare e del virus della Enterite Emorragica (dati non mostrati) (2).

Iter diagnostico caso clinico C. Il ceppo batterico riferibile a *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) è stato sottoposto a tipizzazione biochimica con API NE (Biomèrieux). I tamponi articolari, dopo semina sui terreni di coltura, sono stati analizzati con PCR specifica per ORT (10).

Risultati e discussione

Caso clinico A

In entrambi i conferimenti, le lesioni osservate costantemente sono state: discondroplasia tibiale, osteomielite nella epifisi delle ossa lunghe (femore, tibia) e fragilità ossea. Dal primo conferimento di polli è stato isolato in purezza *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* dal midollo osseo. Il batterio era Gram positivo, esulina positivo su Bile Aesculin Azide agar (OXOID), catalasi negativo, ossidasi negativo e con profilo biochimico 20273061110 con RapidID STREP corrispondente a *Streptococcus bovis* I (il database di questa galleria non prevede l'identificazione di *S. gallolyticus*). Il sequenziamento del 16S (99% di omologia per *S. gallolyticus*) e del 23S (98% di omologia per *S. gallolyticus*) tipizzava in modo definitivo il batterio come *Streptococcus gallolyticus*. Questo microrganismo risultava sensibile ad Ampicillina ed Amoxicillina.

Dalla bibliografia si evince che il primo focolaio di infezione, documentato nel pollo da carne in Belgio (3), ha causato, a differenza di questo episodio, non solo osteomielite ma anche artrite e lesioni setticemiche con epatosplenomegalia e focolai necrotici multifocali diffusi. In un secondo caso in Giappone (8), molto simile al primo per le lesioni setticemiche, non sono però state osservate artrite ed osteomielite. Questi ultimi autori ipotizzano che *S. gallolyticus* sia un batterio opportunisto molto diffuso nelle feci di polli sani e che, solo occasionalmente, in condizioni di stress e/o di altre malattie intercorrenti, possa dare luogo a localizzazioni setticemiche. In alternativa, essi speculano che solamente alcuni cloni virulenti siano in grado di determinare malattia (8).

Caso clinico B

Nella maggior parte dei tacchini conferiti al laboratorio si evidenziava distacco della cartilagine della testa del femore con essudato purulento nell'articolazione coxofemorale come pure in quella corrispondente tibiotarsometarsale (senza lesioni setticemiche). In tre soli animali, le lesioni precedenti erano accompagnate da pericardite e aerosacculite fibrinosa.

Sono stati isolati sette *E. coli* O78: uno dalla testa del femore, tre dalla articolazione coxofemorale e tre dalla tibiotarsometarsale corrispondente (nessun isolato da altri distretti). I batteri erano non emolitici, lattosio positivi, ossidasi negativi, catalasi positivi e con profilo biochimico riferibile a *E. coli* con Microbact GN/12A. Sei ceppi isolati erano sensibili a: colistina, gentamicina, apramicina, aminosidina ed enrofloxacin. Un solo ceppo evidenziava sensibilità anche per trimetoprim-sulfamidico. La presenza in allevamento di questi due antibioticotipi si era già osservata analizzando i visceri (polmone, cervello) a seguito di precedenti episodi di colisettemia. Questi ultimi erano caratterizzati da lesioni riferibili ad artrite, pericardite, aerosacculite e raramente polmonite fibrinosa. Il più grave episodio di colibacilloso con mortalità del 0,5% in pochi giorni si osservava tra la 11 e la 12 settimana di vita preceduto da una duplice infezione virale da parte di Avian Metapneumovirus e del virus della Enterite

Emorragica.

Tutti i 7 *E.coli* O78 erano da considerarsi APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) in quanto positivi per i geni di virulenza *fimC*, *fyuA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*.. Dalla analisi RAPD, 6 isolati su 7 non mostravano similarità genomica con 8 ceppi di *E. coli* O78 isolati da visceri (cervello, polmone, pericardio) di animali colpiti da colisetticemia nelle settimane precedenti. Sulla base di questi dati, si ipotizza che i ceppi di *E. coli* O78 a tropismo articolare avevano una diversa origine clonale rispetto ai setticemici.

Caso clinico C

Tutti i tacchini conferiti presentavano solamente lesioni localizzate bilateralmente tra i fasci dei muscoli flessori delle dita e i tendini (con scarso interessamento dell'articolazione tibiotarsometatarsale). A questo livello era presente un essudato lattiginoso non purulento e privo di fibrina. Dopo 72 ore di incubazione a 37 °C in agar sangue, ORT era isolato con difficoltà da un animale. Molto probabilmente la vitalità del batterio era molto scarsa in sede di lesione. Il batterio isolato era Gram negativo, ossidasi positivo, pleomorfo con profilo biochimico 022004 con API NE. L'indagine con PCR ha permesso di rilevare la presenza di ORT dall'essudato muscolo tendineo di altri due soggetti. Il batterio risultava sensibile ad Ampicillina e Amoxicillina.

Conclusioni

In questo lavoro, è stata diagnosticata una eziologia batterica in tutti e tre i casi clinici di zoppia. *Streptococcus gallolyticus* è da ritenersi patogeno nuovo ma, vista la scarsa casistica, non ancora "emergente" nei nostri allevamenti italiani. *E. coli* e ORT, presenti da anni negli allevamenti di polli e tacchini, si sono confermati comuni agenti eziologici nei casi di zoppia. Si sottolinea l'importanza di una accurata diagnosi dei casi clinici di zoppia, indispensabile per approntare il corretto trattamento terapeutico in allevamento sulla base dell'antibiogramma. A supporto della classica analisi microbiologica è sempre più importante, ove possibile, abbinare tecniche di biologia molecolare per diversi motivi: la tipizzazione del ceppo batterico (es. *S. gallolyticus*), la determinazione del suo patotipo (es. APEC) e la identificazione di batteri di difficile isolamento sui terreni di coltura (es. ORT).

Ringraziamenti

Per il prezioso lavoro tecnico eseguito, gli autori ringraziano i Sig.ri C. Margonari, S. Polinari e S. Trentin

Bibliografia

1. Barnes, J. H., Nolan, L. K., Vaillancourt JP. Colibacillosis. In Diseases of Poultry, 12th ed. Blackwell Publishing, Ames. pag. 691-737. 2008.
2. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. Avian Pathology, 28:593-605. 1999.
3. Chadfield M.S., Christiensen J.P., Decostere A., Christiensen H., Bisgaard M. Geno- and Phenotypic Diversity of Avian Isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and Associated Diagnostic Problems.

- Journal of Clinical Microbiology. Mar. 822-827. 2007
4. Chin R.P., Paul Van Empel, H. M. Hafez, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In Diseases of Poultry, 12th ed. Blackwell Publishing, Ames. pag 765-774. 2008.
 5. Gophna U., Oelchlaeger T.A., Hacker J., Ron, E.Z. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. FEMS Microbiology Letters. 196: 57-60. 2001.
 6. JanBen T., C. Schwarz, P. Preikshat, M. Voss, P. Hans-C, and L. Wiewer. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. Int.J.Med.Microbiol., 291: 371-378. 2001.
 7. Maurer, J. J., M.D. Lee, C. Lobsinger, T. Brown, M. Maier, and S. G. Thayer. Molecular Typing of Avian *Escherichia coli* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. Avian Diseases, 42, 431-451. 1998.
 8. Sekizaky T., Nishiya H., Nakajima S., Nishizono M., Kawano M., Okura M., Takamatsu D., Nishino H., Ishiji, Osawa R. Endocarditis in Chickens Caused by Subclinical Infection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Avian Diseases 52:183-186, 2008
 9. Van Empel P. *Ornithobacterium rhinotracheale*. In Poultry Diseases 6th Elsevier Limited. pag. 164-169. 2008
 10. Van Empel, P., Hafez, H.M., *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathology 28: 217-227, 1999.