

APPLICAZIONE DELLA PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) PER LA CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ENTEROCOCCUS CECORUM* ISOLATI IN CORSO DI SPONDILITE VERTEBRALE DEL BROILER

Bano L.¹, Pascoletti S.¹, De Zan G.¹, Cesca A.², Moret C.¹, Fagioni M.³, Agnoletti F.¹, Drigo I.¹

1 IZS delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba, Treviso

2 Medico veterinario libero professionista, Treviso

3 Bruker Daltonics, Via Cluentina 26/R, 62100 Macerata

Summary

Enterococcus cecorum is increasingly responsible for outbreaks of spondylitis in chickens worldwide. In order to investigate possible relatedness between strains isolated from osteomyelitis, 30 clinical relevant *E. cecorum* strains were processed by MALDI TOF and mass signatures compared by the principal component analysis (PCA). Results evidenced a low differentiation level between strains isolated intra-flock from bone lesions, leading the suspect that a clonal origin is on the base of the disease. Furthermore similar spectral patterns were observed in strains isolated in femoral and vertebral localizations from the same subject.

INTRODUZIONE

Enterococcus cecorum, precedentemente denominato *Streptococcus cecorum*, è un cocco Gram-positivo, anaerobio facoltativo, catalasi-negativo, in grado di idrolizzare l'esculina (7).

Conosciuto come commensale intestinale del pollo adulto, negli ultimi anni è stato segnalato come causa di spondilite, con sempre maggiore frequenza, in diversi paesi, Italia compresa, risultando ormai un patogeno emergente e significativo del pollo da carne (1, 3, 4, 6, 7, 8, 10).

L'infezione si osserva più frequentemente in polli da carne d'età superiore a 28 gg, prevalentemente nel maschio, con possibilità di casi subclinici ed una mortalità che può raggiungere il 15% (1, 4, 5, 6, 8). La malattia è stata riprodotta con maggior successo attraverso somministrazione del patogeno per via orale rispetto a quella intravenosa (5).

Le lesioni macroscopiche risultano eterogenee e comprendono: ostemielite del femore ("necrosi della testa del femore"), artrite e tenosinovite e, meno frequentemente, pericardite/idropericardio (4, 6, 7). Tuttavia la lesione principale e caratteristica è la spondilite a carico della vertebra toracica mobile (T4) che causa stenosi del canale vertebrale e compressione midollare secondaria. Tale lesione è associata ad una tipica sintomatologia clinica caratterizzata da cifosi, stazione sui tarsi e paralisi degli arti. Microscopicamente si osserva un'ostemielite necrotizzante del corpo vertebrale di tipo fibrinoeterofilo, con presenza di cocci Gram-positivi (6, 8).

Nonostante la rilevanza clinica e commerciale di questa patologia, il ciclo d'infezione e la sua patogenesi risultano ancora largamente sconosciuti (6).

Per questa ragione studi recenti hanno indagato tramite genotipizzazione la possibile emergenza di un nuovo clone patogeno e le sue vie di trasmissione (2, 3, 4, 6, 9).

I risultati ottenuti tramite PFGE su ceppi isolati nel corso di malattia, hanno evidenziato come questi siano tra loro strettamente correlati, tanto da ipotizzare l'emergenza di un clone dotato di peculiare patogenicità (2, 3, 6). Inoltre i ceppi isolati da lesioni e quelli isolati dall'intestino dei rispettivi riproduttori sono risultati geneticamente distinti portando ad escludere una possibile trasmissione verticale (6).

In nessuno studio sono state prese in esame possibili correlazioni genetiche tra ceppi isolati da diversi siti di lesione in un medesimo soggetto infetto.

Scopo del presente lavoro è indagare, tramite principal component analysis (PCA), se esistono delle similitudini tra i profili spettrometrici di *E. cecorum*, tali da far ritenere che sussistano connessioni epidemiologiche tra ceppi isolati da soggetti distinti, affetti da spondilite vertebrale (come già confermato dagli studi di PFGE citati) o isolati da organi/distretti diversi dello stesso soggetto.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Tutti i ceppi erano stati isolati tra il 2010 e il 2013, identificati tramite sistema miniaturizzato API RAPID ID 32 Strep (Bio Merieux) o MALDI TOF (Microflex LT, Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) e conservati in criovials (Nalgene) a -80 °C.

In tutto sono stati sottoposti a PCA i profili spettrometrici ottenuti da 30 ceppi di *E. cecorum* isolati da 16 gruppi di broiler commerciali (Tabella 1). Di questi, 9 avevano presentato evidenti lesioni riferibili a spondilite vertebrale mentre negli altri 7 gruppi *E. cecorum* era stato isolato da organi parenchimatosi (fegato, milza, polmone, rene), sierose (pericardio, sacco aereo) o articolazione tibio-tarsica.

In 7 gruppi il microrganismo era stato isolato da più di un soggetto. In 3 soggetti *E. cecorum* era presente sia a livello vertebrale sia femorale. Inoltre in 3 casi i ceppi provenivano dallo stesso allevamento ma erano stati isolati da gruppi diversi in momenti diversi.

Principal component analysis (PCA)

Per l'esecuzione dello studio i ceppi sono stati scongelati su piastre di Columbia agar (Oxoid) incubate in condizioni di microaerofilia per 24 ore. I campioni sono stati sottoposti a protocollo di estrazione proteica che prevede l'utilizzo di acido formico 70% e acetonitrile. Ogni singolo ceppo è stato analizzato in 6 repliche.

Gli spettri da sottoporre all'analisi sono stati ottenuti con strumento Microflex LT (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) con software FlexControl (versione 3.3, Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati acquisiti automaticamente in linear positive mode con un range da 2 a 20000 m/z (massa/carica). Per la ionizzazione delle proteine batteriche d'interesse è stata impiegata come matrice una soluzione satura di HCCA (α -Ciano-4-hydroxycinnamic acid, Bruker Daltonics) in 50% di acetonitrile e 2.5% di acido trifluoroacetico (TFA), come da indicazioni del produttore. Prima di procedere alla "clusterizzazione", lo strumento ha analizzato automaticamente gli spettri grezzi con il software MALDI Biotyper RT Classification (versione 3.1, Bruker Daltonics) confrontandoli con una libreria contenente 4613 spettri di referenza.

Gli spettri sono stati importati nel software MALDI Flex Analysis (versione

3.1, Bruker Daltonics) per essere comparati. Quelli considerati outlier tra quelli ottenuti dalle 6 diverse repliche sono stati eliminati. Gli spettri rimanenti sono stati elaborati quindi con software ClinProt tool 3.0 (Bruker Daltonics) che fornisce valori di varianza tra i diversi pattern spettrali fenotipici ottenuti, permettendo di disporre i ceppi in un dendrogramma.

RISULTATI

Per ciascun ceppo le varie repliche hanno dato origine a spettri sostanzialmente simili tra loro, con l'esclusione mediamente di 1 solo profilo outlier per ceppo. In totale l'elaborazione è stata eseguita su 150 profili spettrometrici.

Gli spettri ottenuti dai vari ceppi inseriti nello studio hanno mostrato una varianza del 35%. In figura 2 viene riportato il dendrogramma ottenuto dall'elaborazione degli spettri tramite software. Dato che i ceppi sono risultati tra loro sostanzialmente omogenei, come dimostra il basso valore di varianza, si è deciso di porre arbitrariamente un cut-off di similarità pari a 5. In base a questo valore è possibile osservare la presenza di 3 cluster principali (figura 2). Tutti i ceppi isolati da lesioni ossee di soggetti appartenenti allo stesso gruppo, appaiono dispersi in uno di questi 3 cluster. Al contrario, ceppi isolati da uno stesso gruppo ma da organi/tessuti diversi da quello osseo, compaiono in 2 cluster diversi. Inoltre gli spettri ottenuti da ceppi isolati da spondilite vertebrale e da necrosi della testa del femore di uno stesso soggetto, presentano elevata similarità. In due dei tre allevamenti in cui la patologia si è ripresentata in gruppi diversi, sono stati isolati ceppi con pattern spettrali diversi tra loro. Tutti i ceppi isolati da lesioni vertebrali nel 2010 si collocano in un unico cluster (centrale).

DISCUSSIONE

La varianza ottenuta dall'analisi delle componenti principali che caratterizzano gli spettri, è stata sostanzialmente bassa, indicando generalmente una stretta analogia tra i vari isolati. La diversa distribuzione dei ceppi isolati da organi/tessuti diversi, anche se da soggetti dello stesso gruppo, rispetto agli isolati da lesioni ossee, fanno sospettare che questi ultimi siano più simili tra loro rispetto a quelli che sporadicamente si isolano da altri distretti.

Infine anche i risultati ottenuti dall'analisi di ceppi isolati dai distretti ossei di uno stesso soggetto (femore e vertebra) lasciano supporre che il ceppo responsabile delle due lesioni sia lo stesso. I risultati ottenuti hanno confermato informazioni epidemiologiche relative a questa patologia, già acquisite con metodi di genotipizzazione consolidati come la PFGE (2, 3, 6). Si rende comunque necessaria una comparazione tra queste due metodiche sugli stessi ceppi per indagare l'attendibilità del metodo spettrometrico che, se confermato, consentirebbe di ridurre i tempi e la laboriosità che metodiche di genotipizzazione richiedono.

CONCLUSIONI

In conclusione la PCA sembrerebbe confermare i dati acquisiti in altri studi di epidemiologia biomolecolare realizzati su base genetica (PFGE), in cui è stata dimostrata una sostanziale clonalità dei ceppi isolati dai singoli episodi di spondilite del broiler (2, 3, 6). Tali risultati dovranno però essere confermati attraverso futuri studi comparativi tra PCA e PFGE eseguiti sugli stessi ceppi.

BIBLIOGRAFIA

1. Bano L., Bonci M., Drigo I., Ferro T., Vascellari M., Cesca A., Agnoletti F. 2010. Spondilite da *Enterococcus cecorum* nel pollo da carne. Atti XLIX convegno SIPA, 29-30 Aprile, Forlì. Pp. 81-85.
2. Boerlin P., Nicholson V., Brash M., Slavic D., Boyen F., Sanei B., Butaye P. 2012. Diversity of *Enterococcus cecorum* from chickens. *Veterinary Microbiology* 157: 405-411.
3. Borst L. B., Suyemoto M. M., Robbins K. M., Lyman R. L., Martin M. P., Barnes H. J. 2012. Molecular epidemiology of *Enterococcus cecorum* isolates recovered from enterococcal spondylitis outbreaks in the southeastern United States. *AvianPathology* 41(5): 479-485.
4. Kense M.J., Landman W. J. M. 2011. Enterococcus cecorum infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. *AvianPathology* 40(6): 603-612.
5. Martin L. T., Martin P. M., Barnes H. J. 2011. Experimental Reproduction of Enterococcal Spondylitis in Male Broiler Breeder Chickens. *Avian Disease* 55: 273-278.
6. Robbins K. M., Suyemoto M. M., Lyman R. L., Martin M. P., Barnes H. J., Borst L. B. 2012. Case Report - An Outbreak and Source Investigation of Enterococcal Spondylitis in Broilers Caused by *Enterococcus cecorum*. *Avian Disease* 56: 768-773.
7. Stalker M.J., Brash M. L., Weisz A., Ouckama R. L., Slavic D. 2010. Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22: 643-645.
8. Tahseen A., Barnes H. J. 2007. Is spondylitis an emerging disease in broiler breeders? *World Poultry* 23(12): 44-45.
9. Wijetunge D. S., Dunn P., Wallner-Pendleton E., Lintner V., Lu H., Kariyawasam S. 2012. Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24(6): 1166-1171.
10. Wood A. M., MacKenzie G., McGillveray N. C., Brown L., Devriese L. A., Baele M. 2002. Isolation of *Enterococcus cecorum* from bone lesions in broiler chickens. *The Veterinary Record* 150(1): 27.

ID gruppo	Allevamento	Ibrido comm.	Incubatoio	Soggetto	Organo/Tessuto
114	A	Ross 708	A	6	Vertebra
			A	2	Vertebra
399	A	Ross 708		4	Vertebra
				5	Vertebra
2253	B	Kabir	D	3	Polmone
			C	1	Pericardio
6083	C	Ross 708		3	Milza
				4	Pericardio
				7	Pericardio
1155	D	Ross 708	C	6	Fegato
1668	E	Ross 708	A	2	Vertebra
1156	C	Ross 708	C	2	Vertebra
2347	F	Ross 308	B	2	Vertebra
				4	Vertebra
1878	G	Ross 308	B	3	Articolazione
4607	G	Ross 308	B	1	Rene
				7	Vertebra
6785	H	Hubbard	E	1	Sacco aereo
			A	1	Vertebra
7340	I	Ross 708		1	Femore
				2	Vertebra
				4	Vertebra
				4	Femore
				5	Vertebra
9564	L	Ross 308	C	5	Vertebra
27	M	Ross 708	A	1	Polmone
			M	2	Femore
548	N	Ross 308		3	Vertebra
				3	Femore
549	O	Ross 308	B	5	Sacco aereo

Tabella 1. Lista dei ceppi inclusi nello studio

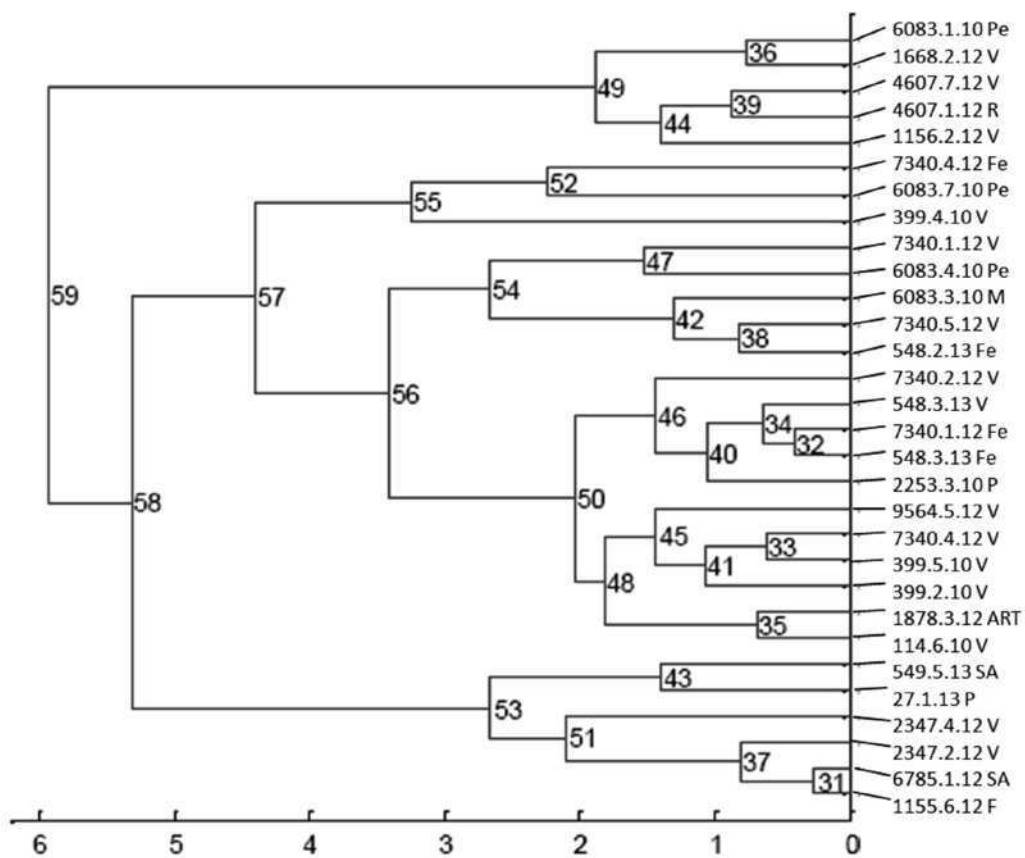


Figura 2. Dendrogramma di ceppi di *E. cecorum* isolati da pollo