

VALUTAZIONE DI UN METODO DIAGNOSTICO PREDITTIVO DELLA SPONDILITE ENTEROCOCCICA IN GRUPPI DI BROILER COMMERCIALI

Cordioli B., Bacchin C., Palazzolo L., Rizzardi A., Montagner A., Zarpellon G., Bottin S., Guolo A., Drigo I., Bano L.

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

Summary

The genus *Enterococcus* includes avian pathogenic species, like *Enterococcus (E.) cecorum*, the causative agent of enterococcal spondylitis in broilers. The symptomatic picture of spondylitis is called “kinky back” and it is associated with osteochondrosis of the free thoracic vertebra (T6). Some authors speculate that the disease is directly related to the degree of the intestinal colonization observed in the first week of life. In the present field study we quantified the intestinal load of *E. cecorum* in 21 broiler flocks through a quantitative Real-Time PCR protocol in 1 to 4 day old chicks. Every flock was monitored until slaughtered and in seven groups enterococcal spondylitis was diagnosed. Based on the molecular results, 1.84×10^8 CFU/g of *E. cecorum* can be considered the predictive value for spondylitis in broiler chickens.

INTRODUZIONE

Il genere *Enterococcus (E.)* identifica cocci Gram-positivi disposti in catene per un totale di 36 specie batteriche (Fisher & Phillips, 2009). In patologia aviaria gli enterococchi possono provocare diverse forme cliniche: onfaliti, endocarditi, encefaliti e patologie articolari (*E. faecalis* in ovaiole e riproduttori ed *E. cecorum* in broiler) a trasmissione diretta e indiretta. I soggetti possono infettarsi in seguito alla contaminazione dell'uovo con materiale fecale, ma anche per via inalatoria, orale, transcutanea o iatrogena (es: lotti vaccinali contaminati da *E. faecalis*) (Pattison et al., 2007). *E. cecorum* è un patogeno anaerobio facoltativo, catalasi e ossidasi negativo, che predilige atmosfere con 5% di CO₂ e terreni solidi addizionati col 5% di globuli rossi di pecora incubati preferibilmente a 35 °C. Studi recenti hanno dimostrato che la sua persistenza nell'ambiente è inversamente proporzionale alla temperatura e all'umidità (Grund et al., 2020). Il microrganismo è responsabile di osteonecrosi e spondilite nel broiler, patologia emergente e cosmopolita comparsa in Italia nel 2009, che coinvolge preferibilmente soggetti maschi a partire da 28 giorni di vita e riproduttori di 6-8 settimane, con mortalità e morbilità che possono raggiungere rispettivamente il 35% e il 15% (Bano et al., 2010; Jung et al., 2018).

Il quadro sintomatologico associato alla spondilite prende il nome di “kinky back”: atteggiamento dovuto al danno spinale che costringe il soggetto a poggiare sui tarsi o sul coccige con gli arti inferiori estesi cranialmente. Le lesioni caratteristiche sono delle osteonecrosi o osteomieliti in cui il tessuto osseo è danneggiato e progressivamente sostituito da materiale necrotico-eterofilico osservabile a livello di corpo vertebrale o di epifisi femorale prossimale. Le lesioni a carico del rachide si localizzano principalmente a livello della sesta vertebra toracica (T6), unica vertebra mobile

della colonna vertebrale del pollo, e talvolta anche di T7 (Wideman, 2016; Palazzolo et al., 2021).

Le sollecitazioni meccaniche a carico dall'apparato scheletrico di soggetti a rapido accrescimento, come gli ibridi commerciali, si concentrano sulla vertebra T6 comportando microfratture ossee simili a quelle che si osservano nelle ossa lunghe in caso di osteocondrosi dissecante (ODC), che può essere seguita da osteonecrosi batterica con osteomielite (BCO) (Wideman, 2016). Infatti, in casi di setticemie da *E. cecorum*, le microemorragie intraossee favoriscono l'invasione di tale tessuto da parte dei batteri circolanti e un loro successivo sequestro all'interno di tessuto osseo immaturo, in cui esercitano attività litica, e la conseguente spondilite. Il procedere del processo litico porta alla formazione di un nucleo di materiale osteo-necrotico-eterofilico che può fistolizzare sia verso la cavità celomatica, dove viene racchiuso da una capsula fibrosa che circonda classicamente la lesione, sia verso il canale vertebrale dove può causare compressioni del midollo spinale in seguito al cedimento del tessuto vertebrale patologico. Le lesioni e la sintomatologia (kinky back) che si osservano in caso di spondilite sono solo le manifestazioni più evidenti di setticemie precoci da *E. cecorum*. Infatti, non è infrequente l'isolamento del microrganismo da organi parenchimosi o da segmenti ossei di pulcini di pochi giorni.

La spondilite da *E. cecorum* risulterebbe correlata direttamente al grado di colonizzazione intestinale osservato nella prima settimana di vita (anche nel primo giorno), come hanno dimostrato 2 studi longitudinali di tipo caso-controllo, condotti con due metodiche diverse: una di batteriologia classica e l'altra su base bio-molecolare (Borst et al., 2017; Jung et al., 2017). Quest'ultima, sebbene sia una tecnica potenzialmente quantitativa, nello studio citato non veniva correlata a una carica intestinale di *E. cecorum*, ma solo a valore CT.

L'obiettivo dello studio è quantificare la presenza di *E. cecorum* in ambito intestinale in broiler di pochi giorni e definire il limite considerabile predittivo per la successiva comparsa di spondilite enterococcica.

MATERIALI E METODI

Sviluppo della metodica diagnostica

A partire da una sospensione di *E. cecorum* (ceppo di riferimento DSM20682) e soluzione fisiologica di torbidità 0,6 McFarland sono state eseguite 10 diluizioni in base dieci. In ogni diluizione è stata quantificata la carica di *E. cecorum* attraverso la semina per spatolamento di 100 µL di sospensione in tre piastre di terreno solido addizionato col 5% di globuli rossi di montone incubate per 24h in condizioni di microaerofilia (5%CO₂).

Le diluizioni che presentavano crescita di *E. cecorum* quantificabile (0-250 colonie) sono state sottoposte, in doppio, a estrazione del DNA batterico con kit MagMax Total (Termofisher) e a Real-Time PCR secondo il protocollo descritto da Jung et al. (2017). Le medie dei valori ottenuti dalle conte microbiologiche e dai valori CT della metodica bio-molecolare sono state rielaborate mediante il software GraphPad Prism 5.0 per ottenere la curva di taratura.

Studio in campo

Lo studio ha riguardato 21 gruppi di broiler commerciali. All'inizio del ciclo pro-

duttivo (1-4 gg), da 3 a 8 soggetti di ciascun gruppo venivano conferiti alla Sezione Diagnostica di Treviso dell'IZS delle Venezie per controlli diagnostici routinari a inizio ciclo.

Da ogni gruppo è stato raccolto un pool di contenuto intestinale prelevato in corrispondenza di ileo terminale, cieco e colon terminale, da sottoporre a Real-Time PCR secondo il protocollo descritto da Jung et al. (2017) e convertite in Unità Formanti Colonia/grammo (UFC/g) secondo la curva di taratura ottenuta nello sviluppo della metodica diagnostica.

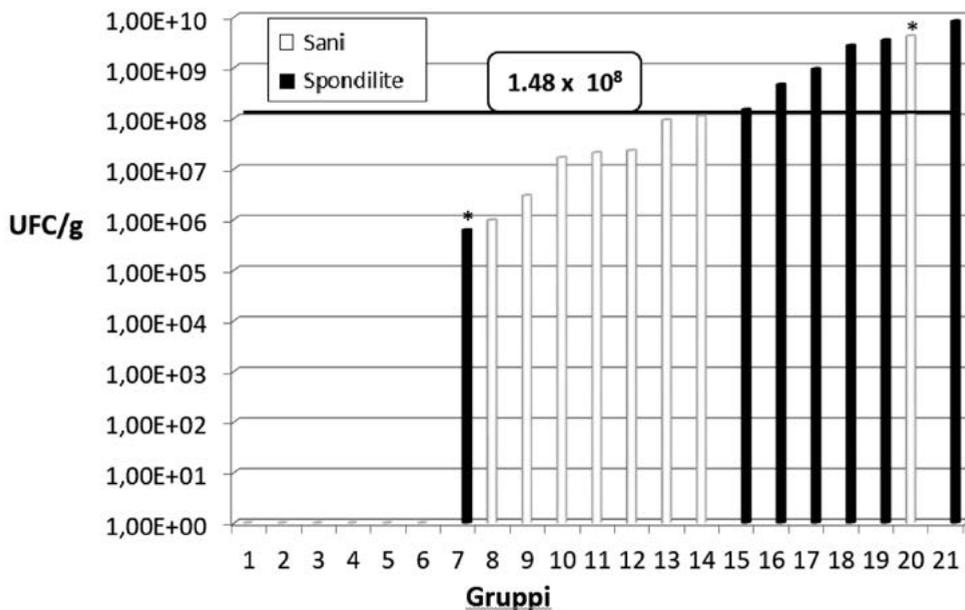
Tutti i gruppi sono stati monitorati clinicamente durante l'intero ciclo produttivo al fine di valutare la comparsa di sintomi riferibili a spondilite. Alcuni soggetti sintomatici sono stati sottoposti ad esame necroscopico in campo per la verifica di lesioni vertebrali ascrivibili a spondilite enterococcica.

RISULTATI

Quattordici gruppi (1-6, 8-14 e 20) non hanno presentato sintomatologia riferibile a spondilite enterococcica. Ad eccezione del gruppo 7, tutti i gruppi che hanno manifestato la patologia presentavano una carica intestinale di *E. cecorum* superiore a $1,48 \times 10^8$ UFC/g a inizio ciclo. Solo un gruppo (20), pur presentando una carica intestinale maggiore rispetto al valore soglia, non ha manifestato la malattia.

I risultati quantitativi di ciascun gruppo di broiler incluso nello studio, vengono riportati in figura 1.

Figura 1 Quantificazione degli enterococchi espressa in UFC/g impiegando una scala logaritmica (ordinate).



DISCUSSIONE

I nostri risultati confermano la relazione esistente tra carica intestinale di *E. cecorum* nei primi giorni di vita e comparsa di spondilite enterococcica, come riportato in letteratura (Borst et al., 2017, Jung et al., 2017). Tuttavia tali studi si sono basati su osservazioni raccolte in numeri esigui di gruppi di broiler, in particolare quello di Jung et al. (2017) che ha messo a confronto la carica intestinale di *E. cecorum* tra solo due gruppi. Il presente studio propone come cut-off predittivo per la spondilite enterococcica, un valore di 1.48×10^8 UFC/g, rilevato nei primi 4 giorni di vita. Infatti sulla base delle quantificazioni intestinali di *E. cecorum* nei gruppi considerati, tale limite conferisce buone sensibilità e specificità alla metodica bio-molecolare nel rilevare i gruppi che manifesteranno la malattia. Solo in due gruppi (7 e 20) la quantificazione di *E. cecorum* in ambito intestinale non è risultata predittiva della spondilite. Per il gruppo 20 tale fenomeno potrebbe essere la conseguenza di eventuali trattamenti antimicrobici somministrati durante il ciclo produttivo per altre patologie e che potrebbero avere influenzato la microflora intestinale, inclusa la componente enterococcica. Il gruppo 7 è stato l'unico che, pur manifestando la malattia nel corso del ciclo produttivo, aveva una carica intestinale inferiore al cut-off proposto. La spiegazione potrebbe essere ricondotta alla presenza di fattori predisponenti la spondilite (es. qualità della lettiera) o a limiti legati alla numerosità del campione e/o alla variabilità degli individui selezionati.

CONCLUSIONI

Il presente studio conferma come esista una correlazione tra carica intestinale di *E. cecorum* all'inizio del ciclo produttivo e la comparsa di spondilite e suggerisce un protocollo diagnostico predittivo utile all'indagine di fattori predisponenti o concomitanti della malattia, a favore di un uso razionale dell'antimicrobico. Il metodo si presta inoltre a studiare tutti i fattori nutrizionali che possono concorrere a mantenere bassa la carica di *E. cecorum* durante il ciclo produttivo (prebiotici, probiotici e oli essenziali ecc.).

BIBLIOGRAFIA

1. Arne Jung, Laura R. Chen, M. Mitsu Suyemoto, H. John Barnes, & Luke B. Borst (2018). A Review of Enterococcus cecorum Infection in Poultry. *Avian Dis* (2018) 62 (3): 261–271.
2. Bano, L., Bonci, M., Drigo, I., Ferro, T., Vascellari, M., Cesca, A., & Agnoletti F. (2010). Spondilite da Enterococcus cecorum nel pollo da carne. 49° Convegno Della Società Italiana Di Patologia Aviaria (SIPA), Forlì. 81-85.
3. Borst, L. B., Suyemoto, M. M., Sarsour, A. H., Harris, M. C., Martin, M. P., Strickland, J. D., & Barnes, H. J. (2017). Pathogenesis of enterococcal spondylitis caused by Enterococcus cecorum in broiler chickens. *Veterinary pathology*, 54(1), 61-73.
4. Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
5. Grund, A., Rautenschlein, S., & Jung, A. (2021). Tenacity of Enterococcus cecorum at different environmental conditions. *Journal of applied microbiology*, 130(5), 1494-1507.

6. Jung, A., Petersen, H., Teske, L., & Rautenschlein S. (2017) Colonization patterns of *Enterococcus cecorum* in two different broiler production cycles detected with a newly developed quantitative real-time PCR. *BMC Microbiol* 17, 106 (2017).
7. Palazzolo L., Cordioli B., Cornaggia M., Viel L., Drigo I., & Bano L. (2021). Aggiornamenti sul ruolo degli enterococchi nelle infezioni dell'apparato scheletrico del pollo da carne. 60° Convegno della Società Italiana Di Patologia Aviare (SIPA), Rimini (RN) 7 Settembre 2021
8. Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M., & Alexander, D. (Eds.). (2007). *Poultry diseases*. Elsevier Health Sciences.
9. Wideman Jr., R. F. (2016). Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review. *Poultry science*, 95(2), 325-344.