

Isolamento di *Arcanobacterium pyogenes* in un episodio di infertilità della coniglia

Cocchi M.¹, Ceglie L.¹, Di Giusto T.¹, Deotto S.¹, Clapiz L.¹, Genero N.¹,
Bregoli M.¹, Lenarduzzi M.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy

²Cooperativa Produttori Conigli, Pordenone, Italy

Corresponding Author: Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via della Roggia, 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676 - Email: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT: *Arcanobacterium pyogenes* as a cause of reproductive disorders in a rabbit breeding. Reproductive pathology is conditioned by several factors, which can influence reproductive rhythm in a farm. In rabbits, infertility can be associated with non-infectious and infectious causes. Several pathogens can lead to infertility; among them *Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus* are the most important. In certain circumstances, *Arcanobacterium pyogenes*, a commensal of mucous membranes, becomes an opportunistic pathogen. In different animal species it can cause suppurative infections involving skin, joints and organs belonging to reproductive and respiratory systems. In this paper we report the isolation of five *A. pyogenes* strains recovered from does with infertility problems. They were isolated from three uteri and two vaginal swabs. Necropsy revealed lesions only in three animals. Results seem to indicate that *A. pyogenes* can cause severe lesions in does, in association with improper management conditions in artificial insemination.

Key words: *Arcanobacterium pyogenes*, Infertility, Doe.

INTRODUZIONE – La patologia riproduttiva è una patologia condizionata e multifattoriale. Diversi sono i fattori che possono influenzare le *performances* riproduttive nell'allevamento cunicolo: qualità e quantità del seme, lo stato fisiologico e sanitario della femmina, oltre a fattori quali un errato microclima (alta temperatura), una inadeguata alimentazione (soprattutto diete con un basso tenore proteico e/o basso contenuto di vitamine A e K) o “eventi stressanti”, in generale. Fra gli agenti eziologici più importanti sono compresi batteri come *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, e *Chlamydophyla abortus* e i virus agenti di malattia emorragica virale e myxomatosi. Accanto a questi, sono riportati in bibliografia casi sporadici di metrite causate da *Moraxella spp.* *Arcanobacterium (A.) pyogenes*, solitamente commensale delle mucose di varie specie animali, è considerato un patogeno opportunisto, responsabile di lesioni piogeniche a carico di cute, articolazioni e organi dell'apparato respiratorio e riproduttivo (Timoney *et al.*, 1988, citato da Jost *et al.*, 2005). Scopo del presente lavoro è descrivere l'isolamento e l'identificazione di ceppi di *A. pyogenes* isolati in coniglie affette da infertilità.

MATERIALI E METODI – Descrizione allevamento. L'allevamento consta di 500 attrici in produzione, gestite con una ciclizzazione a banda unica. E' costituito da due locali distinti, uno dedicato al reparto maternità ed uno all'ingrasso. Il primo presenta 420 fori nido a piano unico con alimentazione automatica e 320 posti rimonta su gabbie

a tre piani parzialmente sovrapposte. La produzione è caratterizzata da una ciclicità di 49 giorni, con inseminazione artificiale a 18 giorni post parto. Mediamente vengono eseguite 500 inseminazioni/ciclo; di queste il 16% è effettuato su fattrici nullipare. La fertilità in generale è superiore all'80%, quella delle nullipare supera l'86%. Il numero medio di nati vivi/parto è rispettivamente di 9,3; quello dei nati morti/parto è pari a 0,6. La perdita delle fattrici nel corso del ciclo produttivo è di circa il 4%. Da fine agosto 2010 si è assistito ad una riduzione della fertilità di circa il 5%, imputabile ad un calo di condizione delle fattrici in seguito al periodo estivo, e ad una costante diminuzione del numero di nati. All'inizio di ottobre, il 35% delle fattrici ha prodotto meno di 6 conigli per parto, mentre il numero dei nati morti è aumentato di circa il 2%. Al fine di stabilire l'eziologia della sindrome, nove fattrici sono state conferite presso la sezione di Udine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, dove sono state sottoposte ad esame anatomico-patologico e a successive indagini laboratoristiche.

Analisi batteriologiche. Per ogni soggetto sono stati eseguiti prelievi da utero, fegato, pericardio, polmone, midollo allungato, milza e cieco. Dai primi quattro organi è stato condotto un esame batteriologico sia inoculando una piastra di agar sangue (AS) e una di eosin-methylen blue (EMB) (esame batteriologico diretto) sia inoculando una brodocoltura di Triptose Soy Broth (TSB) (esame batteriologico indiretto). Tutti i terreni sono stati forniti dal Centro Servizi alla Produzione (CSP, Legnaro, IZSVE). Le piastre di AS sono state incubate per 24-96 h in aerobiosi e in atmosfera modificata (arricchita con CO₂, Campygen, Oxoid), il terreno EMB e le brodoculture per 24-48 ore in aerobiosi. Le brodoculture sono state seminate su AS in caso di crescita negativa all'esame batteriologico diretto. Le letture sono state eseguite ogni 24 h sino al 4° giorno d'incubazione. Dal midollo allungato è stata effettuata la ricerca di *Listeria monocytogenes*, mentre dal pool di fegato, milza e cieco la ricerca di *Salmonella spp.* e *Campylobacter* termofili. Inoltre, in 6 soggetti è stato effettuato un tampone vaginale, sottoposto all'indagine batteriologica come sopra descritto. In base alla morfologia della colonia batterica, la colorazione di Gram, test di catalasi ed ossidasi, i ceppi batterici sono stati identificati tramite kit biochimici miniaturizzati (APY CORYNE e APY STAPH, Biomerieux).

Indagine genotipica. Da ogni soggetto sono stati eseguiti tamponi vaginali per ricerca *Chlamydophyla abortus*. Il DNA è stato estratto con il kit commerciale High Pure PCR Template Isolation (Roche). I campioni sono stati testati mediante un protocollo di Real Time PCR di screening per *Chlamydiaceae* e, successivamente, sono stati esaminati mediante un protocollo di Real Time PCR per discriminare tra le seguenti specie: *Cp. pecorum*, *Cp. psittaci*, *Cp. abortus* e *C. suis*, secondo quanto descritto da Pantchev *et al.* (2009).

RISULTATI E CONCLUSIONI – I risultati dell'esame anatomico-patologico e dell'esame batteriologico (diretto e indiretto) condotto su utero e sui tamponi vaginali sono riassunti in tabella 1. Gli esami batteriologici (diretto e indiretto) condotti su fegato, pericardio e polmone, nonché la ricerca di *Chlamydophyla abortus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* termofili risultavano negativi. *A. pyogenes* è stato isolato in 5 soggetti, sia da esame batteriologico diretto che indiretto, in due soggetti da tampone vaginale ed in tre soggetti da utero. Le colonie di dimensioni pari a 1-2 mm, emolitiche con margini netti sono apparse dopo 72-96 ore incubazione da AS (in atmosfera modificata).

Tabella 1 – Risultato dell'esame batteriologico eseguito da tampone vaginale e da utero (n.e.= non eseguito).

Soggetto	Sito prelievo	Esame batteriologico diretto	Esame batteriologico indiretto	Lesione anatomopatologica
1	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Endometrite purulenta e peritonite ascessuale
	Utero	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	
2	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Assenza di lesioni anatomicamente rilevabili
	Utero	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	
3	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Assenza di lesioni anatomicamente rilevabili
	Utero	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	
4	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Gravidanza extrauterina
	Utero	Negativo	Negativo	
5	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Ascesso tubarico e peritonite purulenta
	Utero	Negativo	<i>Staphylococcus coagulasi negativo</i>	
6	Tampone vaginale	Negativo	Negativo	Gravidanza extrauterina, Ascesso tubarico e peritonite siero fibrinosa
	Utero	Negativo	Negativo	
7	Tampone vaginale	Negativo	Negativo	Endometrite catarrale
	Utero	Negativo	Negativo	
8	Tampone vaginale	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	Endometrite catarrale
	Utero	Negativo	Negativo	
9	Tampone vaginale	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	Endometrite catarrale
	Utero	Negativo	Negativo	

In due soggetti non si sono osservate lesioni macroscopicamente rilevabili, mentre in tre soggetti *A. pyogenes* è stato isolato da endometrite (catarrale e purulenta). Inoltre, nel soggetto 1, il microrganismo è stato identificato anche dalla lesione ascessuale a carico del peritoneo, insieme a *Staphylococcus aureus*. *A. pyogenes* è un batterio commensale, patogeno opportunisto. Esso possiede un elevato numero di fattori di virulenza che contribuiscono a definire il suo potenziale patogeno. Essendo un commensale, la fonte di infezione di *A. pyogenes* è spesso autogena, conseguente a microtraumi delle mucose, favorenti la disseminazione del microrganismo (Jost *et al.*, 2005). Nel presente lavoro, successivamente all'identificazione di *A. pyogenes*, sono stati apportati cambiamenti nella gestione dell'inseminazione, cambiando tipologia di pipetta (lunghezza minore) e applicando misure atte sia a contenere i fattori stressanti per la fattrice sia a migliorare le condizioni igienico-sanitarie. Queste modifiche hanno determinato un ritorno alle performances precedenti il periodo considerato. Le fattrici rappresentano un importante settore nell'allevamento cunicolo; una riduzione dei parametri di fertilità, fecondità e prolificità ha un notevole impatto economico su tutto l'allevamento. I fattori che influenzano le differenti forme di ipo-infertilità sono molteplici. Fra questi, una non corretta gestione dell'inseminazione artificiale (tipologia strumenti, igiene, manipolazione della femmina) può favorire l'impianto e la successiva moltiplicazione di patogeni opportunisti, come *A. pyogenes*.

BIBLIOGRAFIA – Jost, B.H., Billington, S.J., 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:87-102. Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2010. Detection of all *Chlamydomphila* and *Chlamydia spp.* of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33:473-484.