

CASO CLINICO: FOCOLAIO DI CLOSTRIDIOSI DA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN SUINETTI NEONATI

DE LORENZI G.¹, PELLACINI M.², GHERPELLI Y.¹, GIBELLI L.³, PANGALLO G.¹,
BONILAUDI P.¹, DOTTORI M.¹, LUPPI A.¹

¹IZSLER, Reggio Emilia, Italy.

²Ferrero Mangimi spa, Parma, Italy.

³IZSLER, Milano, Italy.

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è descrivere un focolaio di diarrea neonatale da *Clostridium difficile* verificatosi in un'azienda da riproduzione (sito 1) del nord Italia. L'esame culturale, l'esame immunoenzimatico per la ricerca delle tossine e l'esame istologico hanno permesso di confermare la diagnosi di clostridiosi enterica da *C. difficile*. L'allestimento del vaccino stabulogeno e l'implementazione delle misure di biosicurezza adottate hanno permesso la risoluzione del focolaio e di ridurre l'impiego di antibiotici per il contenimento della problematica descritta. La diarrea neonatale è un problema sanitario rilevante nell'allevamento suino. La diagnosi differenziale della diarrea neonatale comprende infezioni batteriche, virali o parassitarie. I clostridi agenti causali di diarrea neonatale sono *C. perfringens* (tipo A e C) e *C. difficile* e quest'ultimo può essere la causa di più della metà delle forme enteriche che si verificano in sala parto (Songer et al., 2000). La fonte d'infezione per i suinetti è rappresentata dall'ambiente in cui le spore vengono eliminate con le feci della scrofa e con le feci dei suinetti del ciclo precedente (Songer, 2012). Le spore ingerite dai suinetti germinano nell'ileo, nel cieco e nel colon con successiva adesione delle forme vegetative alle cellule epiteliali. In assenza di una flora batterica intestinale competitiva le forme vegetative replicano rapidamente ed iniziano a produrre le esotossine responsabili della sintomatologia clinica e delle lesioni anatomopatologiche, quali edema del mesocolon e colite (Yaeger et al., 2007).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico in oggetto ha avuto luogo in un'azienda da riproduzione (sito 1) di 900 scrofe a banda settimanale. I suinetti venivano svezzati a 28 giorni di vita e venduti a 7 kg di peso. Il piano vaccinale di scrofe e suinetti è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Piano vaccinale di scrofe e suinetti (sito 1)

Table 1. Vaccinations of sows and piglets (site 1)

SCROFE
PRV + PRRSV + SIV + <i>H. parasuis</i> + Parvovirus + <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
SUINETTI
Mhyo + PCV2 + <i>Lawsonia intracellularis</i>

A settembre 2017 si osservava la comparsa di forme enteriche e morte improvvisa in suinetti di 2-3 giorni di vita. La morbilità e la letalità osservate erano rispettivamente del 15% e del 90%. Otto suinetti di 3 giorni di vita sono stati quindi conferiti e sottoposti ad esame necroscopico presso l'IZSLER (sezione di Reggio Emilia). I suinetti erano disidratati, anemici e la regione perineale appariva imbrattata di feci diarroiche di colore giallo. All'apertura della cavità addominale si osservava meteorismo intestinale con assottigliamento della parete del piccolo intestino, edema del mesocolon, contenuto di colore giallo e di consistenza pastosa nel colon (Figura 1 e 2). In alcuni soggetti lo stomaco si presentava vuoto, mentre in altri conteneva latte coagulato. Nessun'altra lesione macroscopicamente evidente si osservava in altri organi o apparati.

Le diagnosi differenziali considerate comprendevano forme gastroenteriche sostenute da: *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* tipo A, *Escherichia coli* enterotossigeni, *Salmonella* spp, *Isospora suis*, Rotavirus e virus della diarrea epidemica suina (PEDV).

In sede necroscopica sono stati prelevati campioni da destinare ad indagini diagnostiche (Tab.2).

Campioni di colon sono stati congelati a -20° C per la ricerca delle tossine TcdA e TcdB di *C. difficile*, utilizzando un test commerciale rapido di tipo immunocromatico. Il congelamento dopo il prelievo permette di ridurre risultati falsi negativi, in quanto le tossine di *C. difficile* sono termolabili e tendono a denaturarsi rapidamente.

Per l'isolamento di *C. difficile* il materiale diarroico contenuto nel colon è stato sottoposto a shock alcoolico al fine di selezionare solo le spore di *C. difficile* che riescono a sopravvivere a questa procedura, eliminando così tutti gli altri microrganismi fecali non sporigeni. Il materiale patologico è stato successivamente miscelato con vortex e lasciato sedimentare per 30 minuti a temperatura ambiente. Il sedimento è stato poi seminato su Columbia agar e incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi.

C.difficile è stato isolato in coltura pura da tutti i campioni di grosso intestino sottoposti ad indagine batteriologica. Il test rapido immunocromatico ha permesso di identificare le tossine TcdA e TcdB nei campioni testati.

All'esame istopatologico del colon si osservava infiltrazione di neutrofili nella lamina propria e lesioni erosive a carico dell'epitelio della mucosa intestinale, permettendo così di formulare diagnosi di colite a carattere erosivo. Non erano presenti alterazioni significative nel piccolo intestino e in altri parenchimi.

I risultati degli esami di laboratorio effettuati sono riportati in Tabella 2.

Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale	Rene e milza	Semina su agar siero e Gassner agar incubati a 37°C per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni
	Piccolo intestino	Semina su agar globuli incubato a 37°C per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni
		Semina su agar globuli incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi	Negativo per agenti patogeni
	Colon	Semina su Columbia agar incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi	Sviluppo di <i>Clostridium difficile</i>
Esame parassitologico	Pool di feci	Ricerca di uova di parassiti gastro-intestinali mediante osservazione microscopica previo arricchimento per flottazione	Negativo
PCR Rotavirus (Elschner et al., 2002)	Intestino	Rilevazione della presenza di Rotavirus attraverso l'amplificazione di cDNA a partire da una sequenza specifica di RNA virale del genoma dei Rotavirus gruppo A	Negativa
RT-PCR Real-time PEDV (https://www.cahfs.umn.edu/sites/cahfs.umn.edu/files/rt-pcr-assay-veterinary-diagnostic-lab.pdf)	Intestino	Rilevazione della presenza dell'RNA del virus della diarrea epidemica del suino tramite One-step RT-PCR Real-Time	Negativa
Kit rapido immunoenzimatico	Intestino	Test rapido immunocromatico per le tossine TcdA e TcdB di <i>C. difficile</i>	Positivo
Istologia	Intestino, colon, rene, milza, polmone, fegato, cervello	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	Colite a carattere erosivo. Assenti alterazioni significative nel piccolo intestino e in altri parenchimi

Tabella 2. Campioni prelevati per indagini diagnostiche e risultati
Table 2. Samples collected for diagnostic investigations and results

DISCUSSIONE

Il caso clinico presentato riguarda un caso di diarrea neonatale da *C. difficile* in un'azienda da riproduzione. La diagnosi di enterocolite da *C. difficile* si è basata sul rilievo dei quadri clinici ed anatomopatologici ed è stata confermata dall'isolamento del batterio, dalla dimostrazione delle tossine e dai rilievi istopatologici. Il solo isolamento del batterio non è sufficiente per confermare la diagnosi, il quale infatti è un normale componente della flora intestinale del suino ed esistono ceppi non patogeni che non producono tossine. La conferma di colite da *C. difficile* si ha infatti con la dimostrazione della presenza delle tossine nelle feci o nel contenuto del colon, normalmente impiegando test rapidi immunocromatici generalmente impiegati per la diagnosi di clostridiosi da *C. difficile* nell'uomo. *C. difficile* produce tre principali esotossine: tossina A (TcdA), tossina B (TcdB) e una tossina binaria (CDT). TcdA è un'enterotossina responsabile della perdita di fluidi dall'intestino, mentre TcdB è una citotossina che da sola non è in grado di provocare la patologia, ma potenzia l'azione della tossina A (Songer, 2012). La maggior parte dei ceppi patogeni producono entrambe le tossine, anche se l'azione patogena è mediata principalmente dalla tossina A. L'importanza della tossina CDT nell'insorgenza dei sintomi invece non è ancora ben conosciuta.

Una volta confermata la diagnosi i suinetti con sintomatologia clinica sono stati trattati con tilosina (10 mg/kg) per 3 giorni per via parenterale, ottenendo un buon risultato nel controllo dei sintomi. I ceppi isolati in laboratorio mediante esame colturale sono stati successivamente utilizzati per produrre il vaccino stabulogeno da impiegare in allevamento. Il vaccino stabulogeno inattivato contiene corpi batterici e tossoidi A e B del *C. difficile*, adiuvato a idrossido di alluminio. Il piano di vaccinazione base ha previsto due interventi, il primo a tutte le scrofe e scrofette, il secondo a 20 giorni di distanza dal primo sugli stessi soggetti. Il programma vaccinale proseguirà secondo lo schema previsto, con richiamo 30 giorni prima del parto e continuando la vaccinazione di base nelle scrofette.

Negli ultimi anni la clostridiosi enterica è diventata una causa comune di mortalità nei suinetti sotto scrofa, frequentemente associata a scarsa igiene, svezzamento precoce e stress ambientale. Nell'allevamento oggetto del caso clinico il miglioramento delle condizioni igieniche hanno permesso di ridurre la carica batterica a cui i suinetti erano esposti, contribuendo così a minimizzare il rischio di malattia. Dopo l'adozione delle misure terapeutiche sopracitate, delle misure igieniche e della vaccinazione non sono stati più riscontrati casi di clostridiosi in allevamento.

Figura 1



Figura 2



Fig.1. Edema del mesocolon. Contenuto di colore giallo e consistenza pastosa nel colon

Fig.1. Mesocolonic oedema. Colon filled with pasty yellowish faeces

Fig.2. Edema del mesocolon

Fig.2. Mesocolonic oedema

BIBLIOGRAFIA

Elschner M, Prudlo J, Hotzel H, Otto P, Sachse K. (2002) "Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of group A rotaviruses". *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49(2):77-81.

Yaeger M.J., Kinyon J.M., Songer J.G. (2007) "A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions". *J Vet Diagn Invest.* 19(1):52-9.

Songer J.G. (2012) "Clostridiosis" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Scharz K.J., Stevenson W. "Diseases of swine", 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 714-715.

Songer J.G., Post K.W., Larson D.J., et al. (2000) "Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*". *J Swine Health Prod.* 8(4):185-189.

University of Minnesota New Rapid Semi-Quantitative RT-PCR Assay Developed to Detect Porcine Epidemic Diarrhea Virus. [(accessed on 22 May 2017)];2014 Available online:<https://www.cahfs.umn.edu/sites/cahfs.umn.edu/files/rt-pcr-assay-veterinay-diagnostic-lab.pdf>.