

ISOLAMENTO DI *MYCOPLASMA MELEAGRIDIS* DA UN GRUPPO DI FARAONE (*NUMIDA MELEAGRIS*)

Bilato D., Gobbo F., Facco D., Brustolin M., Battanolli G., Catania S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italy; scatania@izsvenezie.it

Summary

Mycoplasma meleagridis (MM) is considered a specific pathogen of turkeys and recently it has also been isolated in some free-ranging raptors in Germany. In turkeys it causes decreased egg hatchability, skeletal abnormalities and moderate fibrinous airsacculitis in juveniles.

MM experimental infections of turkey embryos, via yolk sac inoculation, produced high incidence of airsacculitis but with low mortality. The same challenge carried out in chicken embryos demonstrated MM replication without significant mortality. Adult chickens are refractory to infection with MM.

The egg route infection has been demonstrated for MM and for this reason MM control in poultry industry should be based mainly on the creation of MM-free breeders groups. In Italy, it is considered an “old” disease last reported more than 15 years ago. In fact, nowadays no specific control programme is applied in the poultry industry to avoid the entering of this pathogen.

During the late summer of 2010 some mortality cases were reported in an experimental breeding farm. The occurrence of such cases have been reported for about two months in a group of guinea fowls meant to be selected for reproduction groups.

The case history describes a group of animals which had never have good production performance and, in particular, poor growth.

Research for mycoplasmas showed the presence of MM in two subjects out of 8 animals examined.

This is the first report of isolation of MM in free range Guinea fowl (*Numida meleagris*) confirming the presence of *Mycoplasma meleagridis* in Italy.

INTRODUZIONE

Mycoplasma meleagridis (MM) è considerato un patogeno specifico del tacchino (1). In tale specie è causa di uno scarso accrescimento ed alterazioni scheletriche durante la fase giovanile, inoltre può essere causa di moderata aerosacculite di tipo fibrinoso. Uova provenienti da gruppi di riproduttori infetti possono presentare riduzione della schiudibilità (1).

Infezioni sperimentali hanno dimostrato un'alta incidenza di aerosacculite a seguito di inoculazione nel sacco vitellino di embrioni di tacchino, anche se raramente si è verificata la morte dell'embrione. L'inoculazione in uova embrionate di pollo ha prodotto la replicazione del patogeno senza però evidenziare mortalità embrionale. Infine infezioni sperimentali condotte su polli adulti hanno dimostrato una refrattarietà del pollo a tale patogeno.

Le ultime segnalazioni di questo patogeno riguardano l'isolamento di MM da trachee di alcuni rapaci selvatici in Germania, gli Autori della segnalazione ipotizzano che tali positività possano essere correlate all'infezione dei rapaci nelle grandi discariche

urbane (2) a dimostrazione del fatto della presenza del patogeno nel territorio europeo.

La trasmissione del MM avviene principalmente per via verticale. Tale peculiarità ha permesso di contenere e gestire la sua presenza nel comparto avicolo attraverso la creazione di gruppi MM *free*, tant'è che ormai tale patologia è considerata dalla maggior parte dei Medici Veterinari Aviani una patologia “vecchia” dato che le ultime segnalazioni risalgono a più di 15 anni fa. Per questi motivi attualmente non sono previsti specifici piani di controllo per tale patogeno.

Il presente lavoro descrive la prima segnalazione di isolamento di *Mycoplasma meleagridis* in un gruppo di faraone (*Numida meleagris*) e conferma la presenza nel territorio italiano di tale patogeno.

CASO CLINICO

Durante la tarda estate del 2010 presso un'azienda sperimentale per l'allevamento e la salvaguardia delle razze avicole venete si sono verificati alcuni casi di mortalità che si sono protratti per circa due mesi in un gruppo di faraone destinato alla formazione dei gruppi riproduttori per la stagione 2011.

L'anamnesi raccolta descriveva un gruppo di animali che non aveva mai presentato buone performance produttive, in particolare vi era stata una stentata crescita con soggetti manifestanti “ali ad elicottero” e continui scarti. Successivamente il problema si era fatto più manifesto con incremento della mortalità. I soggetti di tale gruppo erano schiusi ed erano stati allevati fino alla 4° settimana di vita congiuntamente ad un gruppo di tacchini che aveva presentato sintomatologia simile concomitante con la positivizzazione per Astrovirus. La continua presenza di tacchinotti con accrescimento stentato ha stimolato la ricerca del *Mycoplasma meleagridis* con successiva dimostrazione della presenza di tale patogeno.

MATERIALI E METODI

Alcuni animali, di circa 150 giorni di età, sono stati conferiti presso il nostro laboratorio dove sono stati sottoposti ad esame autoptico ed a ulteriori indagini diagnostiche. In seguito, sulla base dei rilievi anamnestici, dei risultati di laboratorio e sullo scarso miglioramento a seguito della terapia effettuata è stato ritenuto opportuno effettuare ulteriori prelievi in allevamento quali, 8 tamponi tracheali e cloacali, e 20 campioni di sangue-siero, per ricerca diretta ed indiretta dei micoplasmi.

I campioni sottoposti a ricerca micoplasmi sono stati stemperati in brodo (*Mycoplasma Experience*) ed incubati in atmosfera al 5% di CO₂ per almeno 15 giorni. I brodi sono stati valutati giornalmente al fine di evidenziare eventuale viraggio o intorbidimento, in tal caso o in alternativa allo scadere dei 15 giorni, questi venivano inoculati nel medesimo terreno agarizzato e incubati alle medesime condizioni. Le piastre (*Mycoplasma Experience*) sono state valutate giornalmente per evidenziare la presenza di eventuali colonie tipiche per 15 giorni, trascorsi i quali sono state considerate negative. In caso di crescita, si è proceduto alla identificazione di specie mediante metodica DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis). Successivamente si è proceduto al clonaggio al fine di poter effettuare una PCR 16S rDNA per *Mycoplasma spp.*, (3) il prodotto di tale amplificazione è stato sequenziato. La sequenza ottenuta è stata comparata con le sequenze presenti nel *database* del NCBI, permettendo l'identificazione di specie con una omologia del 100%.

Dai prelievi di sangue sono stati invece eseguiti esami per ricerca anticorpi da siero per *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum* in metodica Elisa mediante kit commerciale (IDEXX, Laboratories).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I soggetti conferiti presentavano uno scarso stato di nutrizione con scadente aspetto della livrea. L'esame necroscopico ha rilevato una gravissima ingluvite ed esofagite di tipo necrotico ascrivibile ad infestazione da *Capillaria spp.*. Sono stati rilevati inoltre piccoli depositi fibrinosi a carico dei sacchi aerei, quest'ultimi però non si presentavano ispessiti o vascolarizzati. Sulla base delle lesioni anatomopatologiche gli animali sono stati sottoposti a trattamento ripetuto (3 cicli) con levamisolo con miglioramento temporaneo e ricadute nell'arco di 7-10 giorni.

La ricerca per micoplasmi ha dimostrato la presenza di colonie ascrivibili a *Mycoplasma spp.*, solamente in due soggetti sul totale di 8 animali controllati. In tali animali colonie sospette sono state evidenziate da cloaca mentre nessuna crescita è stata dimostrata in trachea. Tale micoplasma è stato identificato come *Mycoplasma meleagridis* mediante metodica DGGE. Poiché tale specie di micoplasma è considerata specifica del tacchino, abbiamo ritenuto opportuno sequenziare il prodotto di amplificazione di un tratto genomico del 16S ottenendo una ulteriore conferma della identificazione. I campioni di sangue hanno mostrato negatività per MG e MS in ELISA in tutti i soggetti testati (n.20), mentre la ricerca anticorpi verso *Mycoplasma meleagridis* condotto con metodica ELISA ha mostrato reazione "dubbia" solamente in un solo soggetto. Gli animali positivi all'esame colturale sono risultati negativi all'esame sierologico, mentre il soggetto sierologicamente "dubbio" non era tra quelli sottoposti all'esame colturale.

Tali risultati ci permettono di segnalare l'isolamento di *Mycoplasma meleagridis* nella gallina faraona, che sembrerebbe dal punto di vista della sensibilità ai patogeni una specie molto prossima al tacchino come già peraltro dimostrato per altri patogeni specifici del tacchino (4).

Sicuramente il ruolo del *Mycoplasma meleagridis* nel settore gallina faraona dovrà essere maggiormente approfondito. La mancanza di test sierologici validati per questa specie impone l'uso abbinato dei test diagnostici diretti (isolamento, PCR) con quelli indiretti (SAR, Elisa).

BIBLIOGRAFIA

1. Chin R.P., Yan Ghazikhaniam G., and Kempf I. (2008). *Mycoplasma meleagridis* infection. Disease of Poultry 12 th Ed. 834-845
2. Lierz M., Schmidt R., Brunnberg L., and Runge M. (2000). Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from Free-ranging Birds of Prey in Germany. *J. Vet. Med.* 47: 63-67.
3. Johansson K. E., Heldtander M. U. K., Pettersson B. Characterization of Mycoplasmas by PCR and Sequence Analysis with Universal 16S rDNA Primers. *Mycoplasma Protocols*. Edited By Miles R., Nicholas R. Humana Press. 1998 145-165
4. Cattoli G, De Battisti C, Toffan A, Salviato A, Lavazza A, Cerioli M, Capua I. Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl. *Arch Virol.* 2007;152(3):595-602.