

ISOLAMENTO DI UN CEPPLO “ESOTICO” DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*, IN UN FENICOTTERO MINORE (*PHOENICONAIAS MINOR*) DI IMPORTAZIONE. CONSIDERAZIONE SU POSSIBILI VIE DI INTRODUZIONE DEI PATOGENI.

Catania S., Battanolli G., Brustolin M., Mazzacan E., Qualtieri K., Gobbo F., Iob L.

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

Summary

Mycoplasma synoviae (MS) is an important cause of economic loss in the poultry industry. Respiratory and articular diseases are usually associated to MS infection causing high condemnation rates. Different *Mycoplasma* species have been isolated in wild birds although most of them are not considered specific pathogens of poultry. Moreover, there is lack of epidemiological findings on the possible role of wild birds in the transmission of pathogenic mycoplasma to the poultry industry. In this report we described the isolation of *Mycoplasma synoviae* from a captive lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). Tracheal swabs were submitted for *Mycoplasma* isolation in Experience medium and once samples were considered positive, a specific *vlhA* PCR was performed in order to point out any genetic difference between the flamingo MS and those stored in NCBI database. MS was isolated in the only bird showing signs of catarrhal tracheitis and fibrinous aerosacculitis. Sequencing of the product of *vlhA* PCR demonstrated a high identity with MS strains isolated in Australia, and therefore this strain should be considered exotic to the EU. This clinical case is an example of the introduction of an exotic microorganism through the international animal trade.

INTRODUZIONE

I micoplasmi sono organismi unicellulari privi di parete. Possono infettare numerose specie viventi comprese i vegetali, gli animali e l’uomo. Nel settore avicolo, alcune specie come il *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ed il *Mycoplasma synoviae* (MS) sono considerate di particolare interesse in quanto provocano patologie sia nel pollo che nel tacchino che possono ripercuotersi sui parametri produttivi quali incremento della mortalità, scarse *performance* produttive ed un incremento degli scarti al macello. I micoplasmi possono trasmettersi sia per via verticale che per via orizzontale, per tali motivi i principali metodi di prevenzione si basano sulla costituzione di gruppi di riproduttori *free* e sulla scrupolosa applicazione di misure di biosicurezza. Purtroppo ad oggi l’epidemiologia delle micoplasmosi non è ancora del tutto chiara, complice anche la difficoltà di isolamento e di distinzione tra i vari ceppi. Questo comporta una difficoltà nello studio della diffusione della patologia non permettendo di correlare due o più eventi patologici. Per tale motivo in alcuni episodi vengono presi in considerazione, quale fonte di infezione, gli allevamenti rurali o gli uccelli selvatici. Proprio in questi ultimi volatili sono diverse le segnalazioni di isolamento di micoplasmi di interesse avicolo (3).

Recentemente, alcuni Autori hanno dimostrato la possibile differenziazione dei ceppi di *Mycoplasma synoviae* attraverso lo studio di un frammento del gene *vlhA* che

codifica per la *Most Surface Protein* (MSP), una proteina di membrana con attività antigenica (1, 2).

Con questo report segnaliamo l'isolamento di un ceppo di *Mycoplasma synoviae* in un fenicottero minore di recente importazione che dallo studio del gene *vlhA* non manifesta correlazioni con altri ceppi di MS isolati nel territorio italiano.

MATERIALI E METODI

Quattro carcasse di fenicottero minore (*Phoeniconaias minor*) sono state conferite presso la nostra sezione diagnostica a seguito di una mortalità piuttosto importante (10 decessi), manifestatasi in un gruppo di 12 animali recentemente acquistati da un parco zoologico italiano. Dalle carcasse conferite sono stati effettuati differenti approfondimenti diagnostici, quali l'esame anatomo-patologico, esami batteriologici, virologici, parassitologici ed istologici. Inoltre, da tutti gli animali sono stati effettuati tamponi tracheali per ricerca micoplasmi mediante metodica culturale. Il terreno utilizzato è stato il *Mycoplasma Experience*, la procedura ha previsto l'incubazione dei brodi inoculati in atmosfera al 5% di CO₂ per almeno 15 giorni. Detta procedura prevede la valutazione giornaliera delle brodo-colture per evidenziare eventuali acidificazioni o intorbidamenti degli stessi, in caso di acidificazione delle brodo-colture si è proceduto alla successiva semina in agar per l'isolamento. In caso di assenza di acidificazione allo scadere del 15° giorno di incubazione il brodo è stato inoculato in agar ed incubato alle medesime condizioni per ulteriori 15 giorni. I piastrini inoculati sono stati valutati giornalmente al fine di evidenziare le classiche colonie, in caso di assenza di crescita il campione è stato considerato negativo mentre in caso di presenza di colonie ascrivibili al genere *Mycoplasma* è stato considerato positivo. Tutti i brodi considerati positivi sono stati sottoposti a metodica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) per l'identificazione della o delle specie di micoplasma coinvolte.

Nello specifico caso i ceppi di micoplasmi isolati una volta identificati come *Mycoplasma synoviae* sono stati analizzati anche mediante PCR per il gene *vlhA*, secondo il protocollo pubblicato da Hammond e coll. (1), ed in seguito l'amplificato ottenuto è stato sequenziato al fine di evidenziare eventuali differenze.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'anamnesi gli animali presentavano debolezza, letargia, scarse attività motorie e morivano in un grande stato di inanizione. All'esame autoptico si è rilevato in tutti i soggetti uno scadente stato di nutrizione, assenza di alimento nel tratto gastroenterico, presenza di materiale rossastro a livello intestinale, lesioni podali più o meno suppurate. In un solo soggetto, denominato numero 2, è stata rilevata una lieve tracheite di tipo catarrale ed aerosacculite fibrinosa localizzata solamente nel sacco aereo clavicolare. Gli esami batteriologici generici hanno dimostrato la presenza di stafilococchi coagulasi positivi dalle lesioni podali, ed *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* da campioni intestinali. Inoltre dal sacco aereo presentante lesioni sono stati isolati oltre lo stafilococco coagulasi positivo anche *Candida spp.* e *Rhodotorula spp.*. L'esame istologico del sacco aereo ha evidenziato la presenza di focolai infiammatori cronici con presenza di necrosi e cellule giganti multinucleate. La ricerca micoplasmi è risultata essere negativa in tre soggetti, mentre nel soggetto 2 già dopo 24 ore di incubazione è stata evidenziata acidificazione della brodo-cultura.

Dalla successiva semina in agar sono state evidenziate colonie tipiche dopo 24 ore di incubazione. L'identificazione della specie di micoplasma isolata è stata effettuata mediante metodica DGGE ed ha dimostrato la presenza di *Mycoplasma synoviae*.

Il ceppo isolato è stato inoltre sottoposto ad analisi del gene *vlhA*, dimostrando una notevole differenza dai ceppi comunemente isolati nel territorio italiano presenti nella nostra collezione. Inoltre, tale sequenza è stata comparata con le quelle depositate presso il database NCBI, manifestando una maggiore percentuale di similarità (99%) con alcuni ceppi isolati in Australia. Tale comparazione ha inoltre evidenziato alcune differenze con i ceppi di provenienza italiana ed europea presenti nel database.

Sulla base dei dati attualmente disponibili tali analisi permettono di affermare che il ceppo di *Mycoplasma synoviae* isolato nel fenicottero in questione potrebbe essere considerato estraneo al territorio italiano.

Tale segnalazione, a nostro parere, sottolinea quanto già conosciuto per altri patogeni e riveste particolare importanza anche alla luce del numero e della varietà di scambi che coinvolgono specie aviarie esotiche e che inconsapevolmente possono veicolare patogeni estranei ai nostri territori.

BIBLIOGRAFIA

1. Hammond PP, Ramírez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet Microbiol.* 2009 Apr 14;136(1-2):61-8. Epub 2008 Nov 1.
2. Hong Y, García M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis.* 2004 Sep;48(3):606-16.
3. Ley D. H., Berkhoff J. E. and McLaren J. M. *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Dis.* 40(2):480-483. 1996.