

MYCOPLASMA SYNOVIAE E CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC): VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICO SUSCETTIBILITÀ IN FUNZIONE DELLA CATEGORIA PRODUTTIVA E DEL GENOTIPO (VLHA).

Gobbo F., Flaminio B., Fincato A., Baldasso E., Santone C., Catania S.

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

ABSTRACT

Minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial capable to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism *in vitro* cultivation. Mycoplasma are small prokaryotes without cell wall and their growth result "fastidious" making *in vitro* cultivation very difficult.

Mycoplasma species are important pathogens for poultry industry and particularly *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) can cause severe economic losses.

Recently the *Mycoplasma synoviae* has been correlated to economic losses in the layer sectors because of lesions of the apex of the eggshell(1, 2).

In Italy and in other European countries the incidence of MS seems to be increased and in spite of the implementation of biosecurity measures the recurrence of disease is frequently reported, demonstrating that these containment procedures are not always successful in prevention of spread of some Mycoplasma infections. For this reason the therapeutic approach is taking more and more importance and the minimum inhibitory concentration is the unique tool capable to give useful information on the antimicrobial susceptibility of the isolate involved in the outbreaks. Moreover MICs should be implemented in order to avoid the development of antibiotic resistance-mechanisms and to promote a more conscientious use of drugs as the European Commission has recently requested.

In order to differentiate between the circulating strains of *Mycoplasma synoviae* some biomolecular techniques can be applied like the investigation of the gene *vhA* encoding the VlhA hemagglutinin protein, also called MSP (Most Surface Protein) (3).

As different drug treatments are licensed for the different poultry commercial categories it is assume that strains belonged to different categories received a different selective pressure enhancing drug resistance mechanisms for specific antibiotics.

The aim of this study is to gain deeper knowledges of the antimicrobial susceptibility of 20 strains of MS, isolated in different commercial categories (broiler, layer, meat turkey and broiler breeder, turkey breeder and guinea fowl) in order to provide a useful tool for the poultry industry. Moreover we would like to discuss any possible preliminary correlation between the *vhA*-pattern, commercial categories and MICs' results in order to establish if specific genotypes are more frequent in some categories and associated to specific antimicrobial profiles.

INTRODUZIONE

Le specie appartenenti al genere *Mycoplasma spp.* includono microrganismi considerati opportunisti e patogeni del Regno Animale e Vegetale e la loro coltivazione

in vitro risulta “fastidiosa”; sono organismi unicellulari privi di parete cellulare e tale caratteristica limita l’utilizzo di alcune famiglie antibiotiche nel trattamento delle micoplasmosi.

Nel settore avicolo industriale rivestono un ruolo particolarmente importante il *Mycoplasma gallisepticum* (MG), il *Mycoplasma synoviae* (MS) e recentemente nel settore del tacchino da carne il *Mycoplasma iowae* (4).

In particolare il *Mycoplasma synoviae* può causare, nel settore da carne, forme respiratorie ed articolari con conseguente incremento degli scarti al macello, mentre nel settore della gallina ovaioia è stato recentemente associato a lesioni apicali del guscio con importanti implicazioni economiche (1, 2). Inoltre la diffusione di questo patogeno sembra essere in aumento sia nel territorio nazionale che in quello comunitario (5, 6). Tale evidenza sottolinea che le misure applicate fino ad oggi, basate essenzialmente sulla gestione di gruppi di riproduttori *Mycoplasma-free*, sulla attuazione di rigide misure di biosicurezza e di profilassi indiretta, non siano più efficaci nella gestione del controllo di questo patogeno.

Sulla base di queste considerazioni l’approccio terapeutico rimane spesso l’unico mezzo per la gestione del focolaio, ma spesso non è accompagnato dall’isolamento del ceppo e da prove di farmaco-suscettibilità *in vitro*.

La concentrazione minima inibente MIC (Minimum Inhibitory Concentration) è la più bassa concentrazione di una sostanza antibiotica in grado di inibire la crescita visibile o il metabolismo di un microrganismo *in vitro* e tale metodo è considerato il “gold standard” tra tutti gli AST (Antimicrobial Susceptibility Tests) poiché fornisce indicazioni di natura quantitativa, consentendo al clinico una migliore gestione della scelta del farmaco e del regime terapeutico da applicare ad ogni singolo focolaio.

Inoltre, recentemente la Commissione Europea richiede una rivisitazione dell’utilizzo del farmaco a causa delle sempre più frequenti segnalazioni di farmaco-resistenza acquisita in seguito a pressione selettiva, soprattutto per antibiotici “criticamente importanti” per la salute umana (fluoroquinoloni, cefalosporine e macrolidi). La MIC è uno strumento capace di ottemperare a tali richieste promuovendo un più coscienzioso utilizzo del farmaco e permettendo il monitoraggio dello sviluppo di farmaco-resistenze.

Sfortunatamente pochi sono gli studi di natura epidemiologica sui micoplasmi di interesse veterinario, non consentendo di avere una panoramica dei ceppi circolanti in determinate micro-e macroaree e una correlazione tra forme cliniche (patotipi), antibiotico suscettibilità e categoria avicola di provenienza. Attualmente in letteratura il *Mycoplasma synoviae* è distinto in gruppi sulla base della sequenza nucleotidica di una specifica regione del gene *vlhA* che codifica per una PRR (Proline Rich Region) (3, 7) appartenente ad una proteina di superficie correlata alla cito-aderenza ed emoagglutinazione. Diversi fenotipi (emoagglutinazione +/-) si sono dimostrati in sede sperimentale responsabili di una diversa patogenicità nello sviluppo di lesioni articolari nel pollo (8). Ad oggi i genotipi riportati sono 6 (A, B, C, D, E, F), per il tipo C è stata fatta un’ulteriore suddivisione in sottotipi (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) in base all’identità di sequenza nucleotidica di un’altra regione del medesimo gene (RIII) (7). Sulla base di tali considerazioni ci siamo proposti di analizzare la MIC di 20 ceppi di campo di *Mycoplasma synoviae*, provenienti da differenti categorie produttive industriali e cercando una possibile correlazione tra genotipo (*vlhA*), categoria produttiva e suscettibilità antimicrobica.

MATERIALI E METODI

I 20 ceppi di campo selezionati per il presente studio appartengono a diversi settori avicoli industriali: pollo riproduttore (7), broiler (2), gallina ovaiole (6), tacchino riproduttore (3), tacchino da carne (1) e faraona (1). Tali ceppi, disponibili presso la nostra ceppo teca, sono stati rivitalizzati in Experience Medium® (privo di sostanze inibenti) e quindi destinati alla produzione della brodo coltura, alla sua titolazione (UCC-Unit Change Colour) e al test della MIC secondo un metodo procedurato interno e seguendo le indicazioni disponibili in bibliografia con opportune modifiche (9, 10, 11).

I ceppi utilizzati per l'inoculo delle piastre MIC, sono stati diluiti fino a raggiungere un inoculo *standard* di 10^4 UCC/ml. Le micropiastre utilizzate per l'esecuzione del test (Sensititre®) ed il *panel* di antibiotici testati con le relative concentrazioni è riportato nella tabella 1.

In tabella 2 si riportano i valori di *breakpoints* utilizzati nel presente lavoro e disponibili in letteratura. Ogni ceppo è stato testato in replica e un ceppo di riferimento (*Mycoplasma synoviae* NCTC 10124) è stato testato in ogni sessione di prova. Le piastre una volta inoculate sono state incubate a $+ 37 \pm 1^\circ\text{C}$. Il controllo delle piastre è stato eseguito giornalmente al fine di evidenziare il viraggio del pozzetto denominato controllo positivo. Una volta evidenziato tale viraggio la lettura della piastra veniva eseguita annotando in una apposita scheda di lavoro l'ultimo pozzetto che ha manifestato viraggio indice di metabolismo batterico e quindi crescita e vitalità. Il valore di MIC corrisponde al primo pozzetto non mostrante viraggio, palesando l'attività di inibizione da parte dell'antimicrobico testato.

Per lo studio di genotipizzazione una aliquota della brodo coltura è stata destinata ad estrazione del DNA con kit commerciale (Sigma-Aldrich®), il DNA purificato è stato sottoposto a PCR come descritto da Hammond et al. (3) con opportune modifiche. I prodotti di PCR sono stati visualizzati con corsa elettroforetica in gel di acrilamide al 7% e successivamente inviati al sequenziamento. Le sequenze prodotte sono state allineate con il software MEGA® utilizzando come riferimento le sequenze elencate da Hammond *et al.* (2009).

L'allineamento è avvenuto in due fasi: classificazione del genotipo tramite allineamento del PRR (3) e successivamente per i genotipi C classificazione dei sottotipi per comparazione delle sequenze RIII rispetto a quelle postate da Bencina *et al.* (7).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del test sono disponibili nella Tabella 3, i valori di MIC sono associati alla categoria produttiva e al genotipo *vlhA*.

I ceppi testati risultano suscettibili alla tilosina, tilmicosina, spectinomina e lincomicina, e se pur in grado variabile alla ossitetraciclina; al contrario tutti i ceppi testati risultano resistenti alla eritromicina e alla enrofloxacin.

Seppur preliminari, e consci di dover incrementare il numero di ceppi per alcune categorie produttive, di seguito si riportano alcune considerazioni su valori MIC, genotipo *vlhA* e categoria avicola.

I ceppi utilizzati per tale studio sono stati classificati come D (55%), F (25%), H (15%) e C1 (5%), cercando di rispecchiare l'incidenza di isolamento riscontrata presso i nostri laboratori.

Tutti i ceppi con genotipo D ed F risultano suscettibili alla tilosina, tilmicosina, spectinomomicina e lincomomicina, mentre l'ossitetraciclina mostra un leggero spostamento verso valori MIC leggermente più elevati.

Il genotipo H è stato isolato nel settore pollo riproduttore e gallina ovaiole con valori di MIC che evidenziano uno *shift* verso la resistenza antibiotica per tilosina, tilmicosina, ossitetraciclina e lincomomicina.

Il genotipo C sottotipo C1, isolato da broiler, presenta marcata resistenza alla quasi totalità delle molecole testate. Ulteriori ceppi di tipo C1 dovrebbero essere testati per valutare tale caratteristica.

I valori di MIC riscontrati in ceppi provenienti da gruppi di riproduttori hanno manifestato una buona suscettibilità alle molecole testate ad eccezione dei fluorchinoloni, mentre dai ceppi di provenienza dal settore da carne e dalle galline ovaiole è possibile notare valori di MIC leggermente maggiori nelle molecole testate, manifestando in alcuni casi MIC superiori ai breakpoint di resistenza come nei casi del ceppo numero 2 e 17.

Da questo studio si evince che esistono ancora validi strumenti terapeutici nel trattamento terapeutico del *Mycoplasma synoviae*, inoltre risulta evidente in alcuni casi e per alcune molecole lo sviluppo, seppur precoce, di fenomeni di farmacoresistenza.

La MIC può consentire un accurato monitoraggio di questi meccanismi e associata allo studio delle caratteristiche geniche degli isolati, fornire dati utili ad una più approfondita conoscenza della patogenesi e dell'epidemiologia delle micoplasmosi.

Tabella 1. Antibiotici testati con le relative concentrazioni ($\mu\text{g/ml}$)

	Tilosina	Tilmicosina	Lincomomicina	Eritromicina	Spectinomomicina	Ossitetraciclina	Enrofloxacin
A	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
B	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
D	1	1	1	1	1	1	1
F	2	2	2	2	2	2	2
G	8	8	8	8	8	8	8
H	32	32	32	32	32	32	32

Tabella 2. Valori di *breakpoints* ($\mu\text{g/ml}$) per le molecole antibiotiche testate

	S	I	R
Tilosina	≤ 1	≤ 2	≥ 4
Tilmicosina	≤ 8	16	≥ 32
Lincomomicina	*	*	≥ 4
Eritromicina	$\leq 0,5$	*	≥ 8
Spectinomomicina	32	64	128
Ossitetraciclina	≤ 4	8	≥ 16
Enrofloxacin	$\leq 0,5$	≤ 1	≥ 2

Legenda: * non presente, S sensibile, I intermedio, R resistente

Tabella 3. valori di MIC dei 20 ceppi di MS associati alla categoria produttiva e al genotipo *vlhA*.

Ceppo	VlhA Type	Categoria	Til	Tilm	Linc	Eri	Spec	Ossi	Enro
1	F	B	<0,12	0,50	2,00	>32	8,00	8,00	8,00
2	C1	B	8,00	>32,00	>32,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
3	D	BB	<0,12	0,50	1,00	>32	2,00	2,00	>32
4	F	BB	0,50	8,00	2,00	>32	2,00	2,00	>32
5	D	BB	<0,12	0,50	0,50	>32	0,50	0,50	>32
6	D	BB	<0,12	0,25	0,50	>32,00	2,00	8,00	>32,00
7	D	BB	<0,12	0,50	2,00	>32,00	2,00	2,00	>32,00
8	H	BB	0,25	2,00	1,00	>32,00	2,00	8,00	>32,00
9	H	BB	0,50	2,00	1,00	>32,00	8,00	1,00	>32,00
10	D	GF	0,50	8,00	1,00	>32	2,00	1,00	>32
11	F	L	<0,12	0,25	1,00	>32	8,00	2,00	>32
12	D	L	<0,12	0,25	0,50	>32	1,00	0,50	32,00
13	F	L	<0,12	0,25	0,50	>32	2,00	2,00	>32
14	D	L	<0,12	0,50	2,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
15	D	L	<0,12	0,50	0,50	>32,00	2,00	8,00	>32,00
16	H	L	<0,12	8,00	8,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
17	F	MT	<0,12	0,25	2,00	>32	2,00	2,00	>32
18	D	TB	<0,12	<0,12	1,00	>32	2,00	2,00	32,00
19	D	TB	<0,12	0,25	2,00	>32,00	8,00	8,00	>32,00
20	D	TB	<0,12	<0,12	0,50	>32,00	1,00	2,00	>32,00

Legenda: Til: Tilosina; Tilm: Tilmicosina; Lin: Lincomicina; Eri. Eritromicina; Spec: Spectinomina; Ossi: Ossitetraciclina; Enro: Enrofloxacin. B: Broiler; BB, Broiler Breeders; GF: Gallina Faraona; L: Gallina Ovaioia; MT: Tacchino da carne; TB; Tacchino Riproduttore

BIBLIOGRAFIA

1. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.* 2010 Jun;54(2):961-4.
2. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009 38(1):77-85.
3. 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
4. S. Catania, F. Gobbo, D. Bilato, A. Fincato, G. Battannolli, L. Iob. Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. *Letters in Veterinary Record*, 28 Gennaio 2012. Pag. 107-108. doi: 10.1136/vr.e645.

5. S. Catania. Micoplasmata e micoplasmosi nel settore avicolo. Relazione ad invito al L Convegno Annuale SIPA, 7-8 Aprile 2011, Pag63-65.
6. A. Feberwee and W. J. M. Landman. Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae Control and Eradication in dutch Commercial Poultry. 19th International Congress of the IOM, 15-20 July 2012 Tolouse, France. Pag. 33
7. D. Bencina, M. Drobnic-Valic, S. Horvat, M. Narat, S.H. Kleven and P. Dovc. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of Mycoplasma synoviae hemagglutinin. FEMS Microbiol Lett., (2001) 203(1):115-23
8. M. Narat, D. Bencina, S. H. Kleven and F. Habe Hemagglutination-positive phenotype of Mycoplasma synoviae induces experimental infectious synovitis in chickens with a higher frequency than the haemoagglutination-negative phenotype. Infect. Immun(1998). 66, 6004-6009.
9. Hannan P.C.T. (2000) Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 31:373-395.
10. Clinical and laboratory standards institute (2011) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; approved guideline. M-43 Vol. 31 No. 19.
11. Blodgett R. (2010) FDA's Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions.
12. (www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm).

Il presente lavoro è stato sviluppato nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/10 Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole.