

## VALUTAZIONE FENOTIPICA E GENOTIPICA DELLA SUSCETTIBILITÀ AI BETA LATTAMICI IN CEPPI DI *C.COLI* E *C.JEJUNI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC SUSCEPTIBILITY TO B-LACTAMS IN *C.COLI* AND *C.JEJUNI* ISOLATED FROM MEAT CHICKEN FARMS

Casagrande Proietti P., Bellucci S., De Luca S., Guelfi G., Pieramati C., Franciosini M.P.

*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Via San Costanzo 4, Perugia 06100*

### Summary

The study was carried out to determine phenotypically the susceptibility of 80 *Campylobacter* spp. (20 *C. jejuni* and 60 *C. coli*) strains to  $\beta$ -lactams and to assess the presence of the  $bla_{OXA-61}$  gene from both qualitative and quantitative point of view in relation to production of  $\beta$ -lactamase. Finally, the correlation between the expression of the  $bla_{OXA-61}$  gene and the action of sulbactam and clavulanic acid as inhibitors were also evaluated. All strains were investigated by disk diffusion test against the following antimicrobials (AMP), amoxicillin (AML), ticarcillin (TIC), cefalexin (CL), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), meropenem (MEM), imipenem (IMP), ampicillin + sub AMS), amoxicillin + clavulanic acid (AUG), ticarcillin + clavulanic acid (TIC). The antimicrobial susceptibility of ampicillin was determined by Ampicillin M.I.C. Evaluator Strips. Our work showed that almost of the *C. coli* and *C. jejuni* strains, both were resistant to AMP and AML. There were no statistically significant differences between the two species apart from the TIC resistance value, higher in *C. coli*. The strains investigated were highly susceptible to carbapenems. In our case, most all of the strains were nitrocefin positive and showed the  $bla_{OXA-61}$  gene by qRPCR. Poor efficacy of clavulanic acid and sulbactam as inhibitors was evidenced in both *C. coli* and *C. jejuni*, however the only effective association is TIC in *C. jejuni* supporting the hypothesis of a different antibiotic resistance mechanisms played in relation to the *Campylobacter* species.

### INTRODUZIONE

E' noto da tempo come i *Campylobacter* termotolleranti isolati dall'uomo e dal pollame siano resistenti alla maggior parte di antimicrobici inclusi nella famiglia dei beta-lattamici, quali amoxicillina, ampicillina e ticarcillina (Lachance et al., 1991). Tale resistenza è messa in correlazione perlopiù con la presenza di  $\beta$ -lattamasi, presente nella quasi totalità di isolati di *C. jejuni* (83-92%) (Tajada et al., 1996). Il ruolo di questo enzima, comunque, nel determinismo dei fenomeni di resistenza appare spesso controverso. Fliegelman et al. (1985) hanno dimostrato che in alcuni casi la maggior parte di isolati di *C. jejuni* positivi al test nitrocefin per la presenza di  $\beta$ -lattamasi risultava sensibile all'azione dell'ampicillina facendo presupporre l'implicazione di meccanismi diversi nel determinismo della resistenza. Il gene responsabile della produzione di  $\beta$ -lattamasi, designato come  $bla_{OXA-61}$  (Alfredson et al., 2005) mostra identità con i geni  $bla_{OXA-61}$

di *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Griggs et al.2009). Gli inibitori di  $\beta$ -lattamasi più conosciuti sono l'acido clavulanico, seguito dai composti sintetici sulbactam e tazobactam (Gaudreau et al., 1987). Obiettivi del presente lavoro sono stati quelli di determinare fenotipicamente la suscettibilità ai beta- lattamici di ceppi di *C.coli* e *C.jejuni* isolati in allevamento e di valutare la presenza del gene  $bla_{OXA-61}$  da un punto di vista qualitativo e quantitativo in relazione alla produzione di  $\beta$ -lattamasi. Infine è stata messa in evidenza la presenza di una eventuale correlazione tra l'espressione del gene  $bla_{OXA-61}$  e l'azione di sulbactam e acido clavulanico come inibitori.

## MATERIALI E METODI

### Determinazione fenotipica della suscettibilità agli antimicrobici beta-lattamici

Un totale di 80 ceppi di *Campylobacter spp.*, di cui 20 *C. jejuni* e 60 *C.coli* è stato sottoposto a test di suscettibilità agli antibiotici mediante il metodo di diffusione su piastra. I ceppi sono stati seminati su piastre di Mueller-Hinton sangue (5% di sangue defibrinato di montone) su cui sono stati applicati i dischetti contenenti i diversi antibiotici a determinate concentrazioni: amoxicillina (25 $\mu$ g) ticarcillina (75 $\mu$ g) cefalexina (30 $\mu$ g) cefoxitina (30 $\mu$ g) cefotaxime (30 $\mu$ g) ceftazidime (30 $\mu$ g) cefepime (30 $\mu$ g), meropenem (10 $\mu$ g), imipenem (10 $\mu$ g), ampicillina+subalctam (20 $\mu$ g), amoxicillina+acido clavulanico (30 $\mu$ g) ticarcillina+acido clavulanico (85 $\mu$ g). La suscettibilità all'ampicillina è stata valutata mediante E-test (Oxoid). I risultati concernenti ampicillina e cefotaxime sono stati valutati in accordo ai criteri interpretativi della Società francese di Microbiologia mentre per tutti gli altri sono stati utilizzati i breakpoints stabiliti dall'EUCAST per gli Enterobatteri poiché per *Campylobacter spp.* non sono disponibili breakpoints specifici in riferimento a tali antibiotici.

### Determinazione fenotipica della suscettibilità all' ampicillina

La suscettibilità all'ampicillina è stata valutata mediante Ampicillin M.I.C.Evaluator Strips(Thermofisher Oxoid).

### Determinazione dell'attività betalattamasica.

In tutti gli 80 ceppi è stata è stata valutata l'attività beta-lattamasica mediante il test del nitrocefina (Sigma-Aldrich, S.R.L, Milano)

### Determinazione del gene $bla_{OXA-61}$ e quantificazione dell'espressione genica.

Su tutti i campioni, previa estrazione del DNA genomico, è stata eseguita la PCR per la determinazione del gene  $bla_{OXA-61}$  (281 bp). I campioni risultati negativi alla PCR (11/80) e 28 ceppi di cui 14 *C. coli* e 14 *C. jejuni*, considerati rappresentativi del numero totale sono stati sottoposti alla estrazione dell'RNA genomico mediante il Kit Norgen RNA Purification (Norgen-Biotek, Corp, Roma.); l'RNA ottenuto è stato quindi retrotrascritto con i SCRIPT cDNA (Bio-rad Laboratori, Milano). Nei campioni è stata successivamente eseguita la qRT-PCR utilizzando i primers descritti in tabella 1.

**Tabella 1-** Primers utilizzati per qRT-PCR

| Geni           | Sequenze (5'-3')                                       | Bp  |
|----------------|--|-----|
| Gyr-a          | R: ATGCTCTTTGCAGTAACCAAAAAA<br>F: CGACTTACACGGCCGATTTC | 80  |
| 16S            | R: AATCTTGCGACCGTACTCCC<br>F: AGTCCACGCCCTAAACGATG     | 90  |
| $bla_{OXA-61}$ | R: CCAATTCTTCTTGCCACTTC<br>F: GAGTATAATACAAGCGGCAC     | 281 |
| $bla_{OXA-61}$ | R: AATCTTGCGACCGTACTCCC<br>F: AGTCCACGCCCTAAACGATG     | 70  |

### Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il test esatto di Fisher per valutare le differenze nella resistenza agli antimicrobici in *C. jejuni* e in *C. coli*. In particolare per valutare in *C.coli* l'associazione tra l'espressione del gene  $bla_{OXA-61}$  e l'efficacia dell'inibitore acido clavulanico con amoxicillina è stata applicata la regressione logistica binomiale; mentre per determinare l'associazione tra l'espressione del gene  $bla_{OXA-61}$  e l'efficacia dell'inibitore acido clavulanico con ticarcillina è stata applicata una regressione logistica a tre classi. Per valutare l'associazione tra l'espressione del gene  $bla_{OXA-61}$  e l'efficacia dell'inibitore sulbactam con ampicillina in *C.jejuni* è stata applicata una regressione logistica a tre classi.

## RISULTATI

La totalità di ceppi di *C. coli* sono risultati resistenti all'ampicillina, mentre 18 isolati di *C. jejuni* su 20 sono risultati resistenti. Sia i ceppi di *C. coli* che quelli di *C. jejuni* hanno mostrato una prevalenza di resistenza elevata alle penicilline e alle cefalosporine di I, II e III generazione, con differenze significative solo per TIC (P< 0.01) mentre tutti sono risultati sensibili alle cefalosporine di IV generazione e ai carbapenemi. (Tab.2). Tutti gli isolati di *C.coli* si sono mostrati più resistenti alle associazioni TIM e AMS (P< 0.001) rispetto a *C.jejuni* (tab.2). Questi ultimi hanno mostrato una prevalenza di resistenza ad AUG superiore rispetto ai ceppi di *C. coli*. Al test del nitrocefina 1 ceppo su 80 è risultato negativo.

**Tabella 2.** Profilo di antibiotico- resistenza di *C. jejuni* e *C.coli* isolati

|                 |   | AML     | TIC       | CL      | FOX     | CTX      | CAZ      | FEP      | MEM      | IMP     | AMS        | AUG      | TIM        |
|-----------------|---|---------|-----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|---------|------------|----------|------------|
| <i>C.jejuni</i> | R | 20(100) | *14(70)   | 20(100) | 20(100) | 20(100)  | 6(30)    | 0(-)     | 0(-)     | 0(-)    | **14(70)   | 18(90)   | **1(5)     |
|                 | I | 0(-)    | 2(10)     | 0(-)    | 0(-)    | 0(-)     | 13(65)   | 1(5)     | 0(-)     | 0(-)    | 2(10)      | 0(-)     | 2(10)      |
|                 | S | 0(-)    | 4(20)     | 0(-)    | 0(-)    | 0(-)     | 1(5)     | 19(95)   | 20(100)  | 20(100) | 4(20)      | 2(10)    | 17(85)     |
| <i>C.coli</i>   | R | 60(100) | *58(96,7) | 60(100) | 60(100) | 58(96,7) | 24(40)   | 0(-)     | 0(-)     | 0(-)    | **59(98,3) | 40(66,7) | **52(86,7) |
|                 | I | 0(-)    | 1(1,7)    | 0(-)    | 0(-)    | 2(3,3)   | 35(58,3) | 1(1,7)   | 1(1,7)   | 0(-)    | 1(1,7)     | 8(13,3)  | 3(5)       |
|                 | S | 0(-)    | 1(1,7)    | 0(-)    | 0(-)    | 0(-)     | 1(1,7)   | 58(96,7) | 58(96,7) | 60(100) | 0(-)       | 12(20)   | 5(8,3)     |

AML, amoxicillina; TIC, ticarcillina; CL,cefalexina; FOX, cefoxitina; CTX, cefotaxime; CAZ,ceftazidime; FEP,cefepime; MEM,meropenem, IMP; imipenem AMS, ampicillina + sulbactam; AUG, amoxicillina+ac clavulanico; TIM,ticarcillina+ ac.clavulanico. Differenza statisticamente significativa tra gli isolati di *C. coli* e *C. jejuni* \* < 0.01 \*\*P < 0.001

In riferimento alla presenza del gene  $bla_{OXA-61}$  gli 11 campioni negativi alla PCR sono risultati positivi se testati con qRT-PCR. In *C.coli* è risultata un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di  $bla_{OXA-61}$  e la resistenza alle associazioni AUG e TIM, mentre non è stato possibile applicare l'analisi statistica in caso di AMS in quanto i ceppi di *C.coli* sono risultati tutti resistenti e pertanto il campione risultava essere monofattoriale (Tab. 3). In *C.jejuni* si riscontra una associazione statisticamente significativa tra l'espressione di  $bla_{OXA-61}$  e la resistenza AMS, non presente invece per AUG. La presenza di un unico campione resistente a TIM non ha permesso di valutare la significatività di questo dato (Tab. 4)

**Tabella 3** Associazione tra l'espressione genica di  $bla_{OXA-61}$  ( $\Delta Ct$ ) e l'efficacia degli inibitori riscontrata nei 14 isolati di *C.coli*

AMP, ampicillina AMS, ampicillina + sulbactam; AUG, amoxicillina+ac clavulanico; TIM,ticarcillina+ ac.clavulanico.

| N° isolati | AMP | AUG | AMS | TIM | $\Delta Ct$ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-------------|
| 1          | R   | R   | R   | R   | 13,20       |
| 2          | R   | R   | R   | R   | 13,47       |
| 3          | R   | R   | R   | R   | 13,79       |
| 4          | R   | R   | R   | R   | 9,18        |
| 5          | R   | R   | R   | R   | 13,61       |
| 6          | R   | R   | R   | R   | 13,29       |
| 7          | R   | R   | R   | R   | 11,96       |
| 8          | R   | R   | R   | R   | 15,40       |
| 9          | R   | S   | R   | S   | 16,10       |
| 10         | R   | S   | R   | S   | 16,70       |
| 11         | R   | S   | R   | I   | 16,60       |
| 12         | R   | S   | R   | S   | 18,20       |
| 13         | R   | S   | R   | I   | 19,08       |
| 14         | R   | S   | R   | S   | 16,33       |

**Tabella 4** Associazione tra l'espressione genica di  $bla_{OXA-61}$  ( $\Delta Ct$ ) e l'efficacia degli inibitori riscontrata nei 14 isolati di *C.jejuni*

AMP, ampicillina ; AMS, ampicillina + sulbactam; AUG, amoxicillina+ac clavulanico; TIM,ticarcillina+ ac.clavulanico

| N° isolati | AMP | AUG | AMS | TIM | $\Delta Ct$ |
|------------|-----|-----|-----|-----|-------------|
| 1          | R   | R   | S   | S   | 25,79       |
| 2          | R   | S   | S   | S   | 25,29       |
| 3          | R   | R   | S   | S   | 24,12       |
| 4          | R   | R   | R   | S   | 10,38       |
| 5          | R   | R   | R   | R   | 14,05       |
| 6          | R   | R   | R   | S   | 13,93       |
| 7          | R   | R   | R   | S   | 11,38       |
| 8          | R   | R   | R   | S   | 16,58       |
| 9          | R   | R   | R   | S   | 15,84       |
| 10         | S   | S   | S   | S   | 27,03       |
| 11         | S   | R   | S   | S   | 27,05       |
| 12         | R   | R   | R   | S   | 11,47       |
| 13         | R   | R   | R   | S   | 12,63       |
| 14         | R   | R   | R   | S   | 14,00       |

## DISCUSSIONE

La resistenza ad ampicillina e ad altri beta lattamici è stata segnalata ormai da tempo sia nell'uomo che nei polli (Thwaites e Frost, 1999). Nel nostro lavoro la quasi totalità dei ceppi saggati, sia di *C.coli* che di *C.jejuni*, si è mostrata resistente ad ampicillina e amoxicillina che sono largamente utilizzate come terapia in campo avicolo. Non ci sono differenze statisticamente significative tra le 2 specie batteriche a parte i valori di resistenza, registrati per la ticarcillina, più alti in *C.coli*. Va sottolineato che tale resistenza è estesa anche alle cefalosporine di I,II, e III generazione in conformità ad altri lavori (Griggs et al., 2009, Giacomelli et al., 2012), sebbene queste non vengano impiegate nel pollame. La resistenza a questa classe di beta-lattamici è stata descritta anche in *Enterococcus* spp. (Van den Bogaard et al., 2002), in *Salmonella* spp. e in *E.coli* (Liebana et al., 2001; Dutil et al., 2010) provenienti dal pollame. Gli isolati saggati nel nostro studio mostrano invece una elevata sensibilità nei confronti dei carbapenemi, molecole ancora più recenti, in conformità con altri studi (Karikari et al, 2017), in cui è stata messa in evidenza una elevata suscettibilità (in alcuni casi fino al 100%) all'imipenem. La resistenza che *Campylobacter*, proveniente dall'uomo e dal pollame, mostra nei confronti dei beta-lattamici è stata messa in correlazione con l'enzima  $\beta$ -lattamasi sebbene il suo ruolo spesso appare controverso (Lachance et al., 1991). Nel nostro caso la quasi totalità dei ceppi è risultata positiva al test del nitrocefina e va specificato che tutti gli isolati saggati

con qPCR sono risultati possedere il  $bla_{OXA-61}$ , responsabile della sintesi di  $\beta$ -lattamasi di classe D, sebbene espresso in differenti quantità. Per *C.coli* l'acido clavulanico, in associazione con amoxicillina e ticarcillina, ha scarsa azione inibente in quanto si ha un aumento di sensibilità rispettivamente del 20% e del 6, 6% mentre la prevalenza di resistenza ad amoxicillina e sulbactam è stata del 98,3%. Tali risultati sono in accordo con Bush and Jacoby (2010) che affermano che alla classe D di Ambler appartengono oxacillinasi scarsamente inibite dall'acido clavulanico mentre sono in disaccordo con lo studio di Griggs et al., (2009) il quale afferma che l'acido clavulanico in associazione con amoxicillina svolge in modo efficace la sua azione di inibitore. In *C.coli* è risultata un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di  $bla_{OXA-61}$  e la resistenza ad amoxicillina+ acido clavulanico e a ticarcillina + acido clavulanico. Sembra dunque che l'acido clavulanico svolga la sua azione di inibitore in relazione all'espressione genica. Minore è l'espressione genica e di conseguenza minore è la quantità di  $\beta$ -lattamasi prodotta e maggiore è l'azione inibitrice esercitata dall'acido clavulanico. Per *C.jejuni*, il sulbactam in associazione con l'ampicillina ha portato ad un aumento della sensibilità del 10% dimostrando una scarsa azione inibente. E' stata osservata un'associazione statisticamente significativa tra l'espressione di  $bla_{OXA61}$  e la resistenza ad ampicillina più sulbactam dimostrando che anche quest'ultimo ha una azione inibitrice in relazione all'espressione genica. Per *C.jejuni* è risultata una prevalenza di resistenza all'amoxicillina associata all'acido clavulanico pari al 90% e non esiste correlazione tra l'espressione genica di  $bla_{OXA-61}$  e l'efficacia dell'inibitore, supportando l'ipotesi che la resistenza osservata possa essere attribuita anche ad ulteriori meccanismi genetici. Va riportato a tal proposito l'identificazione da parte di Griggs et al. (2009) di un altro gene CjBla2 presente in *C.jejuni* in grado di esprimere una diversa  $\beta$ -lattamasi, responsabile di una aumentata suscettibilità ai penemi e ai meropenemi. E' da sottolineare che in unione con la ticarcillina l'acido clavulanico svolge efficacemente il ruolo di inibitore portando ad una diminuzione della resistenza del 65%, con l'85% dei ceppi sensibili in accordo con Griggs et al., (2009).

## CONCLUSIONI

I risultati del presente lavoro hanno dimostrato una scarsa efficacia di acido clavulanico e sulbactam nelle 2 specie batteriche, sebbene la prevalenza di resistenza è significativamente più alta in *C.coli*. L'unica associazione che si è dimostrata vantaggiosa è stata quella rappresentata da acido clavulanico e ticarcillina, riferita solo a *C.jejuni*. In una nostra precedente ricerca già avevamo riscontrato una resistenza del 30% all'eritromicina riferita a 99 ceppi di *C.coli* non osservata in *C.jejuni* (Pergola et al., 2017) a testimonianza verosimilmente di una diversa suscettibilità legata alla specie. Tale ipotesi appare supportata dalla evidenziazione di una regione fortemente ipervariabile in *C.jejuni*, non presente in *C.coli* che ne può modificare il comportamento (Stahl et al., 2012, Vidal et al., 2016). E' da sottolineare infine come nel presente lavoro i risultati riferiti all'associazione di amoxicillina e acido clavulanico, impiegata in medicina umana nei casi in cui *Campylobacter* risulta resistente a fluorochinoloni ed eritromicina, non siano particolarmente confortanti in tal senso.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alfredson D and V Korolik. (2005). Isolation and expression of a novel molecular class D  $\beta$ -lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2515–2518.
2. Bush K and G.A Jacoby. (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 969–976.
3. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P, Bourgault AM, Cole L, Daignault D, Desruisseau A, Demczuk W, Hoang L, Horsman GB, Ismail J, Jamieson F, Maki A, Pacagnella A, D.R Pillai. (2010). Ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infect Dis.* 16:48–54.
4. Fliegelman RM, Petrak RM, Goodman LJ, Segreti J, Trenholme GM, R.L Kaplan. (1985). Comparative *in vitro* activities of twelve antimicrobial agents against *Campylobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 27:429–430.
5. Gaudreau, C. L., L. A. Lariviere, J. C. Lauzer, F. F. Turgeon. (1987). Effect of clavulanic acid on susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to eight  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:940–942.
6. Giacomelli, M., Andrighetto, C., Rossi, F., Lombardi, A., Rizzotti, L., Martini, M., A. Piccirillo. (2012). Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in northern Italy. *Avian Pathol* 41: 579–588.
7. Griggs D. J., Peake L., Johnson M., Ghori S., Mott A, J. V. Piddock. (2009). Lactamase-Mediated  $\beta$ -Lactam Resistance in *Campylobacter* Species: Prevalence of Cj0299 ( $bla_{OXA-61}$ ) and Evidence for a Novel  $\beta$ -Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3357–3364
8. Karikari AB, Obiri-Danso K, Frimpong EH, KA Krogfelt. (2017). Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Recovered from Faeces and Carcasses of Healthy Livestock. *Biomed Res Int.* 1-9
9. Lachance N, Gaudreau C, Lamothe F, LA Lariviere (1991) Role of the  $\beta$ -lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to  $\beta$ -lactam agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 813–818
10. Liebana E, Guns D, Garcia-Migura L, Woodward MJ, Clifton-Hadley FA, RH Davies. (2001). Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. *J Clin Microbiol* 39: 3609–3616.
11. Pergola S, Franciosini MP, Comitini F, Ciani M, De Luca S, Bellucci S, Menchetti L, P Casagrande Proietti. (2017). Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J Appl Microbiol.* 122: 1348–1356

12. Stahl M, Butcher J, A Stintzi . (2012). Nutrient Acquisition and Metabolism by *Campylobacter jejuni*”, Front Cell Infect Microbiol. 2: 5.
13. Tajada P, Gomez-Garces JL., Alòs JI., Balas D, R Cogollos .(1996 ).Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12  $\beta$ -lactam agents and combinations with  $\beta$ -lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother. 40:1924–1925.
14. Thwaites RT and JA Frost. (1999). Drug resistance in *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* isolated from humans in north west England and Wales, 1997. J. Clin. Pathol. 52:812-814.
15. van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, EE Stobberingh (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother. 49: 497–505.
16. Vidal AB, Colles FM, Rodgers JD, McCarthy ND, Davies RH, Maiden MC, FA Clifton-Hadley .(2016). Genetic Diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from conventional broiler flocks and the impacts of sampling strategy and laboratory method. Appl Environ Microbiol. 82 :2347-2355.

## **MYCOPLASMA SYNOVIAE: UN OTTIMO ESEMPIO DI PATOGENO ADATTABILE ALLE CONDIZIONI DELL’OSPITE. CASO CLINICO**

Catania S., Mainenti M., Zanardello C., Picchi M., Matucci A., Gobbo F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell’Università 10, 35020 Legnaro (PD) Italy, e-mail: [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)

### **SUMMARY**

*Mycoplasma synoviae* (MS) is considered an important pathogen in poultry causing severe economic losses in any type of commercial operation. Particularly in layer hens, lesions such as egg shell abnormalities have caught major attention in the recent years, but also decrease in egg production, egg weight, an amyloid arthropathy in association with *Enterococcus spp.* have been described. This work aims to share a case of MS infection in commercial pullets with an atypical clinical manifestation. Particularly, only 1 house was severely affected by walking difficulties with 80% morbidity, whereas in the other 2 houses scarce clinical signs were present despite the same MS strain was circulating. Full necropsies and laboratory analyses were performed in order to find a possible explanation to such difference. The same strain of MS was recovered by PCR from tracheal swabs in all houses. Interestingly, only the animals belonging to the house severely affected showed MS PCR positivity also in all the joints collected, and no other synergic bacterial or viral agents were retrieved. Moreover, only in these animals a marked decrease in size of the thymus with severe lymphoid depletion was also present, whereas no macroscopic or histologic lesions to this organ were found in the animals from other houses. These data suggest that a difference in the immunitary system may have played a role in the atypical spread of the disease and severity of clinical findings only in one house, especially if we consider that MS usually behaves as an opportunistic pathogen. This underlines that specific host conditions should always be considered when atypical findings involving common pathogen, especially those of “opportunistic microorganism”, are found.

### **INTRODUZIONE**

*Mycoplasma synoviae* (MS) è una delle specie di micoplasmia considerate rilevanti per il comparto avicolo industriale, poiché la sua presenza può contribuire a determinare importanti ripercussioni in termini produttivi. Nel settore della gallina ovaioia, negli ultimi anni tale microrganismo è stato oggetto di particolare attenzione a causa delle anomalie del guscio ad esso correlate (Catania *et al.*, 2010, 2016; Feberwee *et al.*, 2009). Recentemente, Catania e collaboratori (2016) hanno dimostrato, mediante infezione sperimentale, che non tutti i ceppi di MS possono produrre le tipiche lesioni apicali del guscio e che, anche in assenza di lesioni apicali, l’infezione da MS determina una diminuzione del numero delle uova deposte e del loro peso medio, concludendo quindi che l’impatto di MS in tale settore non deve essere solamente correlato alle caratteristiche anomalie. Sempre nella gallina ovaioia ed in particolare nella fase pollastra, una forma di artrite, definita amiloide, è stata riportata in nord Europa in cui *Enterococcus fecalis* e *Mycoplasma synoviae* erano considerati attori o co-attori della lesione