

## AGGIORNAMENTI SULLA VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE IN CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ISOLATI NEL SETTORE AVICOLO

Bottinelli M., Fincato A., Picchi M., Alessandri G., Ceoletta A., Paladino A., Catania S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD) Italia*

### Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is one of the most important *Mycoplasma* species in poultry. This bacterium is responsible of chronic disease and severe economic losses. One of the control strategies that can be applied to contain this highly prevalent pathogen is the antibiotic treatment of infected animals. It is, then, very important for veterinarians to know the antibiotic susceptibility of the circulating strains in order to choose the most appropriate antibiotic molecule. The aim of this work was to evaluate the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of enrofloxacin, oxytetracycline, doxycycline, erythromycin, tylosin, tilmicosin, spiramycin, tiamulin, florfenicol and lincomycin for Italian MS isolates. All MS isolates showed high MIC values of erythromycin and enrofloxacin, while were sensible to tetracyclines. Macrolides were effective in inhibiting MS growth, even though some isolates showed high MIC values of tilmicosin. Seven isolates showed high MIC values of lincomycin, tilmicosin and spiramycin. Since we noted differences between our results and data present in literature, future studies on MIC values of the most used drugs for MS are needed in order to support veterinarians in selecting the proper antibiotic treatment.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma synoviae* (MS) è considerata una delle specie di *Mycoplasma* più importanti per il settore avicolo. Infatti, quest'organismo patogeno determina una malattia cronica negli animali e comporta, conseguentemente, ingenti perdite economiche. Il controllo di questa patologia si basa su strette misure di biosicurezza, protocolli vaccinali (ove disponibili) e specifici programmi di eradicazione nei gruppi di riproduttori a causa dell'abilità di MS di essere trasmesso verticalmente [1]. Nonostante l'applicazione di queste strategie di controllo, la prevalenza di MS resta alta nella popolazione avicola evidenziando l'assenza di un importante tassello gestionale/epidemiologico. Siccome il trattamento antibiotico degli animali può solo mitigare i segni clinici della malattia senza eradicare l'infezione [2], è evidente l'importanza di conoscere la sensibilità agli antibiotici dei ceppi di MS circolanti sul territorio. Infatti, in questo modo si può massimizzare l'efficacia del trattamento e ridurre la pressione selettiva sul microrganismo, evitando di promuovere lo sviluppo di antibiotico-resistenza. Data l'assenza di dati recenti riguardanti la sensibilità di MS agli antibiotici, l'obiettivo del presente lavoro è stato di valutare i valori di Concentrazione Minima Inibente (MIC) di oltre 150 ceppi italiani di MS provenienti da diverse categorie commerciali (pollo broiler, gallina ovaiole e tacchino).

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione dei ceppi di Mycoplasma synoviae*

I ceppi di MS sono stati selezionati dalla collezione dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie sulla base dei seguenti criteri: anno d'isolamento, specie aviare, settore avicolo e genotipo. La selezione è avvenuta con lo scopo ultimo di rappresentare, per quanto possibile, la situazione epidemiologica di campo. Ogni isolato appartiene a un singolo focolaio di malattia.

### *Coltivazione in vitro dei ceppi*

I ceppi sono derivati da attività di campo o necroscopica, in seguito alla raccolta di tamponi tracheali in animali con sintomatologia ascrivibile a MS. I tamponi sono stati rapidamente inoculati nel terreno di trasporto Mycoplasma Experience® (ME, Reigate, UK) e conferiti presso il laboratorio per la coltivazione di *Mycoplasma* spp. seguendo la nostra procedura interna.

### *Identificazione di Mycoplasma synoviae e analisi vlhA*

L'analisi del gene *vlhA* è stata effettuata per escludere la presenza di ceppi vaccinali e per selezionare i ceppi sulla base della prevalenza italiana. Per identificare la specie di *Mycoplasma*, un'aliquota di 300 µL da brodi sospetti positivi è stata sottoposta ad estrazione del DNA, e il DNA ottenuto è stato testato con 16S rRNA PCR e Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

### *Valutazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC)*

La procedura MIC è stata effettuata tramite microdiluizione in brodo seguendo la nostra procedura interna, la quale si basa sulle linee guida di Hannan con alcune modifiche [3] e la procedura standardizzata per i micoplasmi umani [4]. Sono state utilizzate piastre MIC commerciali da 96 pozzetti contenenti antibiotici liofilizzati (Merlin Diagnostik®). Gli antibiotici inclusi nelle piastre MIC sono: enrofloxacin, ossitetraciclina, doxyciclina, eritromicina, tilosina, tilmicosina, spiramicina, tiamulina, florfenicolo e lincomicina. Dopo l'inoculo batterico, le piastre sono state incubate a 37±1°C e controllate entro 24-48 ore. Ogni ceppo è stato testato in duplicato e considerato valido quando entrambe le piastre MIC producevano risultati identici.

## **RISULTATI**

Sono stati ottenuti valori di MIC elevati per enrofloxacin ed eritromicina. I valori di MIC di doxyciclina e ossitetraciclina ottenuti sono sovrapponibili e differiscono di una sola diluizione. A differenza della tilosina e delle altre molecole, che hanno mostrato una distribuzione unimodale dei valori di MIC, la tilmicosina ha mostrato una distribuzione bimodale con 26 ceppi aventi MIC ≥32 µg/mL. Inoltre, 7 ceppi hanno mostrato alti valori di MIC per tilmicosina, lincomicina e spiramicina. Tutti i ceppi hanno mostrato valori di MIC ≤4 µg/mL per il florfenicolo.

## **DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti dal nostro studio sono coerenti con i dati italiani precedenti, mentre mostrano differenze rispetto a quelli riportati in altri lavori esteri [5,6,7,8,9,10]. Infatti, sono stati riscontrati valori elevati di MIC per enrofloxacin nonostante questa

sia considerata una tra le molecole d'elezione per il trattamento delle micoplasmosi. I ceppi testati hanno mostrato una buona sensibilità nei confronti delle tetracicline e un'elevata resistenza all'eritromicina, dato atteso per questa molecola. I valori di MIC per i macrolidi denotano una buona efficacia di questa classe di antibiotici, con la tilosina che può considerarsi uno dei farmaci d'elezione; tuttavia, è stata rilevata la presenza di isolati con valori di MIC elevati per la tilmicosina. È bene segnalare che, nonostante il possibile utilizzo di tali molecole nel settore avicolo, resta da comprendere la causa di tale apparente discrepanza. La maggior parte dei ceppi si è dimostrata sensibile alla spiramicina, alla tiamulina e al florfenicolo, seppur alcuni ceppi abbiano mostrato alti valori di MIC per lincomicina, tilmicosina e spiramicina.

### CONCLUSIONI

Continuare a studiare l'andamento dei valori di MIC di questo *Mycoplasma* impattante per il settore avicolo, insieme al consolidamento del dato pregresso, risulterà di fondamentale importanza per supportare i veterinari nella selezione del farmaco ed evitare lo sviluppo di antibiotico-resistenza.

### BIBLIOGRAFIA

1. Swayne DE, Glisson JR. (2013). Diseases of Poultry. – 13<sup>th</sup> ed.
2. Kleven SH. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52: 367-374.
3. Hannan PCT. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet Res.* 31: 373-395.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas: approved guideline. *CLSI document.* M43-A Vol. 31 No. 19. Available from: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m43/>
5. Lysnyansky I, Gerchman I, Flaminio B, Catania S. (2015) Decreased susceptibility to macrolide-lincosamide in *Mycoplasma synoviae* is associated with mutations in 23S ribosomal RNA. *Microb. Drug. Resist.* 21(6): 581-589.
6. Hannan PCT, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann H. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents. Ch.* 1997;41: 2037-2040.
7. Dufour-Gesbert F, Dheilley A, Marois C, Kempf I. (2006). Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet. Microbiol.* 114: 148-154.
8. Landman WJM, Mevius DJ, Veldman KT, Feberwee A. (2008). *In vitro* antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry. *Avian Pathol.* 37(4): 415-420.
9. Kreizinger Z, Gróznér D, Sulyok KM, Nilsson K, Hrivnák V, Benčina D, et al. (2017). Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe. *BMC Vet. Research.* 13: 342.