

VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI BIOFILM DA PARTE DI DIVERSE SPECIE DI MICOPLASMI ISOLABILI IN SPECIE AVICOLE INDUSTRIALI

Bottinelli M.¹, Picchi M.¹, Tondo A.¹, De Grandi G.¹, Fincato A.², Rossi I.¹, Merenda M.¹, Catania S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 Verona-Vicenza, via San Giacomo 5, 37157 Verona (VR), Italy.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT3 Laboratorio sierologia e malattie pianificate, viale dell'università, 35020 Legnaro (PD), Italy.

Summary

Recent studies reported some mycoplasmas are able to produce biofilm, which seems to make them more resistant to surrounding stresses in the host and in the environment. At present, there is no study aimed at assessing this ability in different avian *Mycoplasma* field strains. Thus, it was decided to investigate the major avian *Mycoplasma* species, in particular *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM), *M. iowae* (MI), as well as some minor ones, including *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* and *M. pullorum*. A total of 40 isolates were inoculated into a specific broth medium in 48-well microtiter plates. After incubation, the plates were washed and stained at two different times for optical biofilm formation evaluation. Thirty-five percent of the isolates produced biofilm. Four MG isolates, three MS isolates and three MM isolates were biofilm producers. Only one isolate of each minor avian *Mycoplasma* species produced biofilm and none of MI isolates was biofilm producer. Interestingly, not all the examined avian isolates are able to produce biofilm *in vitro*. It is important to continue studying the ability of producing biofilm in avian mycoplasmas since this could be a key feature for understanding better their epidemiology.

INTRODUZIONE

I micoplasmi sono microrganismi considerati “parassiti obbligati” degli epiteli del tratto respiratorio e genitourinario degli animali e dell'uomo (1). Sebbene non abbiano una parete cellulare e siano apparentemente danneggiabili dal sistema immunitario dell'ospite, i micoplasmi riescono a persistere nei siti di colonizzazione anche in presenza di una forte risposta infiammatoria. Inoltre, sono sensibili agli agenti atmosferici al di fuori dell'ospite. Tuttavia è stato osservato che alcuni micoplasmi sono in grado di sopravvivere in presenza di condizioni avverse, come superfici solide, e di persistere nell'ambiente più di quanto ci si aspetterebbe (2). Sappiamo che per altre specie batteriche la capacità di produrre biofilm, ovvero la creazione di strati di cellule batteriche circondate da una matrice polisaccaridica *gel-like*, è connessa con un'aumentata resistenza agli antibiotici e alla risposta immunitaria dell'ospite (3). Studi recenti hanno dimostrato che anche alcuni micoplasmi sono in grado di produrre biofilm e tale capacità potrebbe spiegare come mai le infezioni da micoplasmi siano difficili da trattare con gli antibiotici, oppure il motivo per cui diventino croniche (4). Inoltre, data l'insorgenza di nuovi focolai in assenza di connessioni epidemiologiche evidenti, è lecito pensare che tramite

il biofilm i micoplasmi possano sopravvivere lontano dalla risposta immunitaria e gli agenti atmosferici per poi tornare a dare malattia in un secondo momento. Sono ben noti i problemi causati dalle micoplasmosi nell'industria avicola, sia in termini di perdite economiche che produttive. Studiare la capacità dei micoplasmi aviari di produrre biofilm potrebbe aiutare a comprendere meglio le enigmatiche dinamiche epidemiologiche che caratterizzano le micoplasmosi del settore avicolo. Tuttavia, non sono disponibili dati riguardanti tale capacità nei ceppi di campo. Per questo motivo abbiamo deciso di valutare se alcune specie di micoplasmi isolabili nel pollame fossero in grado di produrre biofilm.

MATERIALI E METODI

Selezione dei ceppi

Per questo studio sono stati utilizzati i ceppi presenti nella ceppoteca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Le specie di micoplasma incluse nello studio sono: *Mycoplasma (M.) gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *M. iowae*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* e *M. pullorum*. Per ogni specie di micoplasma sono stati selezionati cinque ceppi. Come controllo positivo sono stati selezionati due ceppi di *M. gallisepticum* produttori di biofilm (*M. gallisepticum* S6 e *M. gallisepticum* 6/85).

Coltivazione in vitro dei ceppi

Il protocollo di coltivazione dei ceppi è basato su quanto riportato da McAuliffe e collaboratori (2006) a cui sono state apportate alcune modifiche descritte qui di seguito. I ceppi sono stati coltivati in terreno selettivo sterile per micoplasmi. Ogni ceppo è stato inoculato in un pozzetto di una piastra da 48 pozzetti contenente il terreno selettivo. Ogni ceppo è stato coltivato in duplicato. Ad ogni piastra è stato aggiunto del terreno selettivo sterile come controllo negativo. Le piastre, sigillate in superficie, sono state incubate a 37°C in aerobiosi per 28 giorni.

Visualizzazione del biofilm e classificazione dei ceppi produttori

La procedura per la visualizzazione del biofilm è stata effettuata a 28 giorni post-inoculo. Brevemente, la piastra veniva sciacquata con acqua distillata e poi colorata con una soluzione di cristalvioletto allo 0.5%. La presenza di biofilm veniva confermata dall'osservazione della colorazione permanente del fondo del pozzetto.

RISULTATI

Su un totale di 40 ceppi coltivati, 14 (35%) hanno prodotto biofilm (vedi Tabella 1). Una certa variabilità nella produzione di biofilm è stata osservata tra le varie specie analizzate. Quattro ceppi di *M. gallisepticum*, tre ceppi di *M. synoviae* e tre ceppi di *M. meleagridis* hanno prodotto biofilm. Nessun ceppo di *M. iowae* ha prodotto biofilm. Le restanti specie di *Mycoplasma* studiate hanno mostrato la produzione di biofilm in una percentuale più bassa (solo un ceppo su cinque).

Tabella 1:

Specie di <i>Mycoplasma</i>	Produzione di biofilm				
	I ceppo	II ceppo	III ceppo	IV ceppo	V ceppo
<i>M. gallisepticum</i>	+	+	+	-	+
<i>M. synoviae</i>	-	+	-	+	+
<i>M. meleagridis</i>	+	-	+	-	+
<i>M. iowae</i>	-	-	-	-	-
<i>M. gallinarum</i>	-	+	-	-	-
<i>M. gallinaceum</i>	-	-	-	+	-
<i>M. iners</i>	-	-	-	+	-
<i>M. pullorum</i>	+	-	-	-	-

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Il nostro studio dimostra che, seppur con una certa variabilità interspecifica, molte delle specie di micoplasmi aviari studiate sono in grado di produrre biofilm *in vitro*. La capacità di produrre biofilm potrebbe permettere al ceppo di sopravvivere in condizioni avverse sia *in vivo* che su superfici abiotiche. Tale dato apre a possibili ipotesi sulla diffusione dei micoplasmi nell'ambiente, che in alcuni casi sembrerebbe essere particolarmente fuori dagli schemi. Tramite questo lavoro di ricerca siamo riusciti a creare le condizioni *in vitro* affinché i micoplasmi aviari possano produrre biofilm. Inoltre abbiamo messo a punto un metodo efficace per visualizzare otticamente il biofilm, rendendo il sistema applicabile alla routine diagnostica. Sicuramente, studi futuri su larga scala saranno necessari per comprendere meglio le differenze tra i biofilm prodotti dalle varie specie di *Mycoplasma* nonché le capacità acquisite dai micoplasmi stessi in questo stato di "resistenza" nell'ambiente. L'obiettivo finale sarà quello di comprendere il ruolo, verosimilmente cruciale, nella complessa epidemiologia di tali affascinanti microrganismi.

BIBLIOGRAFIA

1. Cassell GHWA, Clyde J. and Davis JK. (1985) Mycoplasmal respiratory infections. In: Razin S, Barile MF (Eds.), The Mycoplasmas: Mycoplasma Pathogenicity Vol. 4, Academic Press, Orlando, FL, pp. 65-106.
2. McAuliffe L. (2010). Secrets of a successful minimalist-safety in numbers. *Microbiologist*. 11: 33-36.
3. Mah TF and O'Toole GA. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends. Microbiol.* 9: 34-39.
4. McAuliffe L, Ellis RJ, Miles K, Ayling RD and Nicholas RA. (2006). Biofilm formation by *mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*. 152: 913-922.