

## STUDIO DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) IN ALCUNI CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* ISOLATI IN ITALIA.

Gobbo F., Brustolin M., Battanoli G., Qualtieri K., Bilato D., Iob L., Catania S.,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale Dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD), Italy; [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)

### Summary

Minimum inhibitory concentrations (MICs) are defined as 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.

MS causes respiratory and articular disease with condemnation of carcasses and consequently economic impact. Recently some authors described a particular lesion of the apex of the eggshell correlated to MS infection in the oviducts of layer hens (1, 3).

In Italy the incidence of this pathogen seems to be increased even if the co presence of *Mycoplasma gallisepticum* could underestimated MS spreading.

Nowadays prevention of mycoplasmosis is based mainly on breeding stock PPLO-free (Pleuropneumonia like organisms) and implementation of biosecurity measures to avoid introduction of the microorganism in the farm. Unfortunately these containment procedures have been not successful in prevention of spread of some Mycoplasma infection.

On the contrary biotechnology techniques are able to differentiate accurately between strains through the investigation of the gene *VhLA* encoding the MSP (Most Surface Proteins) (4).

The aim of this study is to gain deeper knowledges of the antimicrobial susceptibility of some strains of MS, isolated in different commercial categories (broiler, hen layer, meat turkey and chicken breeders) in order to provide a useful tool to the poultry industry. Moreover we applied an additional selective parameter to test different MS strains, basing on *VhLA* gene sequence.

Our preliminary results confirmed a good susceptibility for lincosamides, oxytetracycline, and macrolides excluding erythromycin.

### INTRODUZIONE

La concentrazione minima inibente più comunemente conosciuta con l'acronimo anglosassone MIC (Minimal inhibitory concentration) è considerata il “gold standard” per la determinazione della suscettibilità dei microrganismi agli antimicrobici tanto da essere utilizzata per confrontare le *performance* di altri metodi diagnostici.

In micoplasmologia la MIC può essere definita come la più bassa concentrazione di una sostanza antibiotica in grado di inibire la crescita visibile o il metabolismo di alcune specie di micoplasmi dopo un ottimale periodo di incubazione *in vitro*.

I micoplasmi sono organismi unicellulari privi di parete cellulare, che possono

causare patologia nel Regno Animale e Vegetale e la loro coltivazione *in vitro* risulta “fastidiosa”..

Nel settore avicolo rivestono un ruolo particolarmente importante il *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ed il *synoviae* (MS). 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.

L'incidenza nel territorio italiano di MS negli ultimi anni sembrerebbe essere in incremento.

Poiché la via di trasmissione verticale di questi patogeni è stata ampiamente documentata il controllo degli organismi *PPLo-like* (Pleuropneumonia Organism like) nel settore avicolo industriale è basato sulla gestione di gruppi di riproduttori *Mycoplasma-free* e sulla attuazione di rigide misure di biosicurezza.

Nonostante tali precauzioni la prevalenza di questi microrganismi nel settore avicolo industriale non sembra diminuire. Recentemente alcuni Autori hanno proposto di raggruppare i ceppi di MS in base alla sequenza del gene *vlhA*. Tale gene codifica per la proteina MSP (Most Surface Protein), responsabile della citoaderenza e quindi della patogenicità.

Sulla base di tali considerazioni ci siamo proposti di analizzare la MIC di ceppi di *Mycoplasma synoviae*. isolati nel territorio italiano e provenienti da differenti categorie produttive industriali e cercando, ove possibile, di testare ceppi provenienti dalla stessa categoria produttiva e con differenze geniche a carico del gene *vlhA*.

## **MATERIALI E METODI**

I ceppi conservati nella nostra ceppoteca sono stati selezionati attraverso determinati criteri, quali la specie animale, la categoria produttiva di origine ed infine il sequenziamento del gene *vlhA* secondo la metodica pubblicata da (4).

I ceppi selezionati, sono stati rivitalizzati in Experience Medium (privo di sostanze inibenti), ed in seguito clonati. Una volta ottenuto il clone questo è stato sottoposto a prove di crescita per individuare il momento idoneo per l'esecuzione del test, secondo le linee guida per l'esecuzione della MIC dei micoplasmi di interesse veterinario (5).

Le colture, in fase logaritmica, sono state suddivise in sub-aliquote di 2 ml e stoccate a -80 °C previa aggiunta di glicerolo sterile 5%v/v. Una di tali aliquote, dopo scongelamento, è stata utilizzata per la titolazione del ceppo attraverso il metodo delle UCC (Unit Change Colour). I ceppi utilizzati per l'inoculo delle piastre MIC, sono stati diluiti fino a raggiungere un inoculo *standard* di 10<sup>5</sup> 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.

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 l'ultimo pozzetto che ha manifestato viraggio indice di metabolismo batterico e quindi crescita e vitalità.

La MIC riportata è rappresentata dalla concentrazione del pozzetto successivo al pozzetto virato.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La scelta dei ceppi sulla base dei dati di categoria ha permesso la selezione di ceppi provenienti dal settore pollo riproduttore, tacchino riproduttore, tacchino da carne e gallina ovaioia. Tali ceppi sono stati ulteriormente analizzati mediante studio del gene *vlhA*. I ceppi che avevano specifiche differenze di sequenza a livello del gene *vlhA* sono stati classificati come “deleti” o “non deleti”.

I ceppi selezionati sono stati 6 di cui due provenienti dal settore pollo riproduttore, due dal settore gallina ovaioia, uno dal settore tacchino da carne e infine uno dal settore pollo da carne.

La lettura della MIC è stata effettuata tra le 24 e 48 ore per tutti i ceppi testati, ed è riportata nella tabella 1. I risultati ottenuti confermano in grandi linee i dati riguardanti la suscettibilità *in vitro* per il *Mycoplasma synoviae* (6). I ceppi da noi testati manifestano una buona suscettibilità *in vitro* per i lincosamidi, le tetracicline ed i macrolidi ad esclusione dell'eritromicina, dato peraltro già dimostrato anche da altri Autori (2). Infine i ceppi da noi testati non sembrerebbero manifestare suscettibilità *in vitro* ai fluorchinoloni.

Tale dato merita sicuramente un futuro approfondimento e valutazione mediante l'incremento del numero di ceppi da testare, anche se si allinea con alcuni recenti risultati che descrivono una riduzione della suscettibilità *in vitro* del *Mycoplasma synoviae* nei confronti di tale classe di molecole (2, 6, 7).

## 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. Dufour-Gesbert, F., Dheilly, A., Marois, C. & Kempf, I. (2006). Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. Veterinary Microbiology, 114, 148-154.
3. 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.
4. 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.
5. Hannan Peter CT, A review article: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet. Res. 2000, 31:373-395.
6. Landman WJM, Mevius DJ, Veldman KT and Feberwee A. In vitro antibiotic susceptibility of Dutch *Mycoplasma Synoviae* field isolates originating from joint lesions and the respiratory tract of commercial poultry. Avian Pathol. 2008, 37 (4):415-420.
7. Stanley, W.A., Hofacre, C.L., Speksnijder, G., Kleven, S.H. & Aggrey, S.E. (2001). Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin. Avian Diseases, 45, 534-539.

**Tabella 1.**

	Til	Tilm	Lin	Clin	Eri	Clo	Flor	Spec	Ossi	Dano	Enro	Marb	Tula
Ceppo 1	<0.12	0.5	1	0.25	>32	8	2	2	2	>32	>32	>32	1
Ceppo 2	0.5	8	2	1	>32	8	8	2	2	>32	>32	>32	4
Ceppo 3	<0.12	0.5	2	1	>32	8	32	8	8	8	8	8	2
Ceppo 4	<0.12	0.25	2	0.5	>32	2	2	2	2	32	>32	>32	2
Ceppo 5	<0.12	0.25	1	0.25	>32	8	2	8	2	32	>32	>32	2
Ceppo 6	<0.12	0.25	0.5	<0.12	>32	1	1	1	0.5	8	32	>32	1

Legenda: Til: Tilosina; Tilm: Tilmicosina; Lin: Lincomicina; Clin: Clindamicina; Eri: Eritromicina; Clo: Cloranfenicolo; Flor: Florfenicolo; Spec: Spectinomina; Ossi: Ossitetraciclina; Dano: Danofloxacin; Enro: Enrofloxacin; Marb: Marbofloxacin, Tula: Tulatromicina.

Ceppo 1: MS isolato da riproduttori broiler deleto;  
 Ceppo 2: MS isolato da riproduttori broiler non deleto;  
 Ceppo 3: MS isolato da broiler non deleto;  
 Ceppo 4: MS isolato da tacchini non deleto;  
 Ceppo 5: MS isolato da galline ovaiole non deleto;  
 Ceppo 6: MS isolato da galline ovaiole non deleto.