

STUDIO DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) IN CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ISOLATI NEL TRIENNIO 2010-2012

Flaminio B., Gobbo F., Qualtieri K., Sturaro A., Battanolli G., Catania S.

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

Summary

Mycoplasma are small prokaryotes lacking in cell wall. They are found in humans, animals, plants and insects. In particular, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) is considered an important pathogen for poultry industry: MG infection consists of a respiratory syndrome with airsacculitis, characterized by infraorbital sinusitis in turkey and reduced egg production in layers and breeders, causing severe economic losses. The control of mycoplasmosis is carried out by the maintenance of *Mycoplasma-free* animals and high levels of biosecurity, but if these measures are not sufficient, an antimicrobial therapy is required.

In order to obtain the therapeutic success and to avoid the onset of drug-resistance mechanisms, the practitioners should make use of the MIC (Minimum Inhibitory Concentration), that is the lowest concentration of an antibiotic able to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism in *in vitro* cultivation.

The aim of this study is to investigate the antimicrobial susceptibility of some MG strains isolated in the years 2010-2012 from different commercial categories (broiler breeder, hen layer, meat turkey and chicken breeder). MICs were performed using the microdilution method with commercial plates.

Our preliminary results show a good susceptibility for spectinomycin. Even if we noticed some resistant strains, the macrolides, especially the tylosin and the tetracycline could represent a good candidates for the therapy. Moreover the tested strains showed a resistance to fluoroquinolones, and lincomycin.

INTRODUZIONE

I micoplasmici sono piccoli procarioti appartenenti alla classe dei *Mollicutes*, delimitati soltanto da membrana plasmatica, in quanto mancano di parete cellulare. Essi sono ampiamente diffusi nel mondo, e sono in grado di infettare una vasta gamma di ospiti, inclusi uomo, animali, piante ed insetti.

In particolare, *Mycoplasma gallisepticum* è considerato un patogeno molto importante nel settore avicolo, in grado di dar luogo a sintomatologia clinica di notevole entità, con conseguenti gravi perdite economiche. Esso è responsabile nel pollo e nel tacchino di una grave sindrome respiratoria caratterizzata nel tacchino da tumefazione dei seni infraorbitali e aerosacculite, e può anche provocare nei riproduttori calo dell'ovodeposizione e mortalità embrionale, essendo dunque causa di notevoli perdite economiche.

Appare dunque chiaro come il controllo di questo patogeno a livello industriale sia fondamentale: l'applicazione di alti livelli di biosicurezza in allevamento e il mantenimento di animali *Mycoplasma-free* possono in alcuni casi però non essere

misure sufficienti, e di conseguenza la terapia antibiotica rimane uno strumento importante in possesso del medico veterinario per contenere le infezioni. La scelta del chemioterapico più opportuno va compiuta in modo oculato, allo scopo sia di ottenere una buona risposta terapeutica che di evitare l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza.

A tal fine, per avere una stima della suscettibilità o della resistenza di un determinato microrganismo agli antimicrobici, si può utilizzare il calcolo della MIC (Minima Concentrazione Inibente), cioè la determinazione della più bassa concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita e/o il metabolismo di un microrganismo *in vitro*. In aggiunta, integrando i valori di MIC calcolati con i *breakpoints* di sensibilità (ossia le concentrazioni, espresse in µg/ml, definite da organizzazioni internazionali come soglia per esprimere la sensibilità o la resistenza dei microrganismi agli antibiotici), si può avere una valutazione dei dati *in vitro* sulla possibile sensibilità o resistenza del ceppo nei confronti della molecola testata.

In base a quanto esposto, è stato deciso di testare la suscettibilità alle principali molecole antibiotiche di alcuni ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* appartenenti a differenti categorie produttive di avicoli industriali isolati nel triennio 2010-2012.

MATERIALI E METODI

13 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum*, provenienti da altrettanti focolai di malattia verificatisi nel triennio 2010-2012, sono stati isolati nel laboratorio di microbiologia diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Padova e stoccati nella nostra ceppoteca. 4 ceppi sono stati isolati da tacchini da carne, 3 da tacchini riproduttori, 4 da galline ovaiole e 2 da polli riproduttori.

I suddetti ceppi sono stati poi rivitalizzati in Experience Medium®, e sottoposti a tre clonaggi seriali, sia in fase liquida che in fase solida, al fine di ottenere delle colture clonali. Al terzo passaggio in terreno liquido si è proseguito con la produzione della brodocoltura per la MIC, inoculando 1 ml del terzo passaggio in 9 ml di terreno colturale per micoplasmi. Le colture ottenute, in fase logaritmica, sono state suddivise in sub-aliquote e stoccate a -80°C per almeno 24 ore. Un'aliquota, dopo scongelamento, è stata utilizzata per la titolazione della brodocoltura, utilizzando il metodo UCC (Unit Changing Colour). I ceppi titolati sono quindi stati inoculati in micropiastre Sensititre®, previa opportune diluizioni al fine di ottenere un inoculo con titolo standard di 10^3 - 10^5 UCC/ml. Le molecole testate comprendevano tilosina, tilmicosina, lincomicina, eritromicina, spectinomicina, ossitetraciclina, ed enrofloxacin.

Le piastre venivano controllate giornalmente per evidenziare l'avvenuta crescita nel pozzetto del controllo positivo: una volta riscontrata l'acidificazione di tale pozzetto, la MIC dei ceppi in esame, ossia il primo pozzetto in cui non si assiste a viraggio indice di crescita batterica, veniva riportata in un apposito foglio di lavoro.

I valori di MIC ottenuti per i ceppi in esame sono riportati nella tabella 1.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I ceppi sottoposti a prova hanno manifestato una evidente resistenza nei confronti della maggior parte di molecole testate dato facilmente evidenziabile attraverso la valutazione delle MIC 50 e MIC 90 del presente studio ad eccezione di alcune molecole quali la spectinomicina, la tilosina e l'ossitetraciclina. In particolare la

spectinomomicina è risultata essere la molecola più efficace manifestando l'attività inibente migliore testimoniata dal fatto che la MIC 50 è al di sotto del breakpoint di sensibilità, mentre la tilosina e la ossitetraciclina hanno manifestato una MIC 50 comparabili con i *breakpoints* di suscettibilità intermedia.

Una buona efficacia è stata riscontrata per la spectinomomicina, poiché 10 ceppi su 13 hanno manifestato valori di MIC inferiori ai *breakpoints* di sensibilità.

I ceppi testati hanno manifestato una discreta suscettibilità nei confronti dei macrolidi: in particolare 5 di essi, di cui 4 isolati da gallina ovaioia ed uno da tacchino, presentavano valori di MIC inferiori ai *breakpoints* di sensibilità verso la tilosina, inoltre due isolati da pollo riproduttore sono stati classificati come intermedi per la tilosina. La tilmicosina ha manifestato valori di suscettibilità nei soli 4 ceppi isolati da gallina ovaioia. Infine l'eritromicina, è risultata efficace in 3 ceppi mentre il 4° è stato classificato come intermedio. Sembra dunque che *Mycoplasma gallisepticum* stia acquisendo meccanismi di antibiotico-resistenza verso questa classe di antibiotici, anche se in misura minore verso la tilosina, la quale sembra possedere delle capacità specifiche intrinseche alla molecola che rendono più efficace la sua attività nei confronti dell'MG.

L'ossitetraciclina, ha mostrato attività nei confronti di due isolati, mentre 7 isolati sono stati classificati come intermedi, che risulta essere un dato interessante dato l'utilizzo storico di tale molecola.

Mycoplasma gallisepticum si è invece dimostrato resistente alla lincomomicina e all'enrofloxacin, con soltanto un ceppo risultato suscettibile verso quest'ultima.

Tali dati forniscono una valutazione iniziale sull'efficacia *in vitro* delle principali molecole antibiotiche nei confronti di *Mycoplasma gallisepticum*: essi necessitano però di ulteriori indagini aumentando il numero di isolati e dei principi attivi da testare.

Da questi risultati preliminari appare però evidente una situazione di criticità relativa al trattamento terapeutico nei confronti di MG dato che la maggior parte di molecole testate mostra l'inefficacia della molecola *in vitro*. Per tale motivo ulteriori studi di antibiotico suscettibilità sono consigliati al fine di indirizzare correttamente l'utilizzo dei farmaci evitando quindi di favorire fenomeni di iniziale o potenziale resistenza che sono già in atto nella popolazione di MG isolati negli anni precedenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical and laboratory standards institute (2011) Methods for Antimicrobial Susceptibility testing for human Mycoplasma; approved guideline. M-43 Vol. 31 No. 19.
2. 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
3. Hannan, P.C., Windsor G.D., de Jong A., Schmeer N., Stegemann M. (1997). Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. Sep;41 (9):2037-40

| | Til | Tilm | Linc | Eri | Spec | Ossi | Enro |
|-----------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Ceppo 1 | 0,5 | 32 | >32 | >32 | 8 | 32 | >32 |
| Ceppo 2 | 2 | 32 | 32 | 32 | 2 | 2 | 32 |
| Ceppo 3 | 2 | 32 | 32 | 32 | 2 | 8 | 32 |
| Ceppo 4 | <0,12 | <0,12 | 8 | <0,12 | 8 | 8 | >32 |
| Ceppo 5 | 8 | >32 | 32 | >32 | >32 | 32 | >32 |
| Ceppo 6 | 8 | >32 | 32 | >32 | >32 | 8 | >32 |
| Ceppo 7 | <0,12 | <0,12 | 8 | <0,12 | 8 | 8 | 8 |
| Ceppo 8 | 8 | >32 | >32 | >32 | >32 | 32 | >32 |
| Ceppo 9 | 8 | >32 | 32 | >32 | 8 | 8 | >32 |
| Ceppo 10 | 8 | >32 | 32 | >32 | 8 | 8 | >32 |
| Ceppo 11 | <0,12 | <0,12 | 8 | 2 | 8 | 8 | >32 |
| Ceppo 12 | <0,12 | <0,12 | 8 | <0,12 | 8 | 2 | 0,5 |
| Ceppo13 | >32 | >32 | >32 | >32 | 8 | 32 | >32 |

Tabella 1: Valori di MIC ottenuti.

Til=Tilosina; Tilm=Tilmicosina; Linc=Lincomicina; Eri=Eritromicina;
Spec=Spectinomomicina; Ossi=Ossitetramicina; Enro=Enrofloxacin.

Ceppo 1, 9, 10 e 13: MG isolati da tacchino da carne

Ceppi 2 e 3: MG isolati da pollo riproduttore

Ceppi 4, 7, 11 e 12: MG isolati da gallina ovaioia

Ceppi 5 e 6: MG isolati da tacchino riproduttore

| | Til | Tilm | Linc | Eri | Spec | Ossi | Enro |
|--------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| MIC 50 | 2 | 32 | 32 | 32 | 8 | 8 | 32 |
| MIC 90 | 8 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |

Tabella 2: Valori di MIC50 e M)IC 90.

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."