

CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DELL'ACQUISIZIONE DI RESISTENZA NEI CONFRONTI DI ENROFLOXACINA IN CEPPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE*.

Catania S.¹, Rodio S.¹, Baldasso E.¹, Gerchman I.², Mikula I.², Levisohn S.²
Lysnyansky I.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy scatania@izsvenezie.it

² Mycoplasma Unit, Department of Avian and Fish Diseases, Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel

ABSTRACT

Minimum inhibitory concentration (MIC) is the lowest concentration of an antimicrobial capable to inhibit the visible growth or metabolism of a microorganism *in vitro* cultivation. Mycoplasma species are important pathogens for poultry industry and particularly *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) can cause severe economic losses.

In Italy and in other European countries the incidence of MS seems to be increased. Moreover recent reports showed an increase of acquired resistance to enrofloxacin.

The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility of 73 MS isolates, isolated in different European Countries and Israel from different commercial poultry categories (broiler, layer, meat turkey, broiler breeder, turkey breeder) and to evaluate the mechanism of acquired resistance to enrofloxacin in these isolates. The biomolecular approach was used to study acquired resistance of MS field strains to enrofloxacin by characterisation of Quinolone Resistance-Determining Regions (QRDRs) known as sites accumulated mutations in fluoroquinolone resistant bacteria.

Our results showed high MICs values for enrofloxacin in the MS recent strains (2009-2012) in particular in the area where high density of poultry flocks is present. In addition, correlation between the MIC values and the mutations in the QRDR of *parC* gene was identified.

INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma synoviae* (MS) risulta essere uno dei micoplasmi aviari considerati importanti per il settore avicolo. La sua prevalenza nel settore avicolo europeo (1) e italiano risulta elevata, a fronte di un evidente contenimento delle problematiche relative al *Mycoplasma gallisepticum*. La sua elevata presenza nel settore produttivo determina non poche problematiche principalmente connesse a problemi articolari, respiratori e recentemente alla produzione di uova con guscio anomalo.

Sulla base di tale dati l'esigenza di trovarsi nelle condizioni di trattare un gruppo infetto, al fine di contenere le perdite economiche, non risulta così remota. I fluorochinoloni ed in particolare enrofloxacin, sono stati considerati un gruppo di farmaci di primo intervento in corso di micoplasmosi. Recentemente alcuni Autori hanno riportato un incremento della resistenza del *Mycoplasma synoviae*

nei confronti di tale molecola (2, 3), ancor più recentemente abbiamo potuto verificare l'elevata resistenza di ceppi di MS isolati sia dal territorio italiano che da altri stati europei (4).

L'acquisizione di resistenza nei confronti dei fluorochinoloni avviene principalmente attraverso la mutazione della regione denominata "Quinolone Resistance-Determining Regions" (QRDRs) del gene *parC* o *gyrA* (che codificano per la subunità A della DNA-girasi e per la topoisomerasi IV) e/o in alternativa dei geni *gyrB* o *parE* (che codificano per la subunità B della DNA-girasi e per la topoisomerasi IV). In particolare è stato riportato che a seguito di selezione *in vivo* la topoisomerasi IV (gene *parC*) sia target specifico per MS (5).

Sulle basi di tali dati abbiamo deciso di valutare in ceppi di *Mycoplasma synoviae* isolati in diverse regioni europee la presenza di particolari correlazioni tra le mutazioni nelle regioni "QRDRs" del gene *parC* e la concentrazione minima inibente rilevata *in vitro* secondo il calcolo della Minima Concentrazione Inibente attraverso il metodo delle microdiluizioni in brodo.

MATERIALI E METODI

Un totale di 73 ceppi di *Mycoplasma synoviae* isolati tra il 1995 ed il 2012 sono stati analizzati nel presente studio. Di questi 44 ceppi sono stati isolati in Israele, 12 in Austria, 11 in Italia, 4 in Spagna e infine 2 ceppi in Belgio. Tutti i ceppi isolati provenivano da differenti categorie produttive quali riproduttori, broiler, tacchino e ovaioia.

Su tutti i ceppi è stata valutata la MIC attraverso un protocollo operativo interno seguendo le linee guida raccomandate da Hannan (6), il range di concentrazione testata variava da 0.03 $\mu\text{g/ml}$ a 64 $\mu\text{g/ml}$. Abbiamo considerato come sensibili all'enrofloxina i ceppi con MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$, mentre gli isolati con MIC di 1 $\mu\text{g/ml}$ sono stati classificati come intermedi ed infine come resistenti tutti i ceppi con MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$.

Tutti gli isolati sono stati sottoposti ad estrazione, di seguito il DNA ottenuto è stato utilizzato per la reazione di amplificazione. I *primers* utilizzati sono riportati in Tabella 1. Brevemente il ciclo di amplificazione utilizzato è stato il seguente: 3 minuti a 95°C; 30 cicli 95°C per 30 secondi; 60°C per 30 secondi; 72°C per 45 secondi e infine 72° C per 5 minuti.

I prodotti di amplificazione sono stati di seguito sequenziati presso l'unità di sequenziamento del Weizmann Institute (Rehovot, Israel) ed infine analizzati con DNASTAR software, versione 5.06/5.51, 2003 (Lasergene, Inc. Madison, Wisconsin, USA).

Inoltre tutti i ceppi testati sono stati classificati in gruppi secondo le caratteristiche geniche legate al gene *vlhA* (7).

RISULTATI

Alcuni dei risultati del presente studio sono disponibili in forma schematica nei Grafici 1- 6.

Meno della metà degli isolati del presente studio hanno mostrato suscettibilità nei confronti della enrofloxacin con valori di MIC tra 0.03 e 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (Grafico 1). Gli isolati degli anni più recenti (2009-2012) hanno mostrato una minore antibiotico suscettibilità rispetto agli isolati degli anni passati (Grafico 2), tale dato

risulta molto evidente negli isolati di provenienza israeliana ed italiana (Grafico 3) i quali hanno mostrato valori di MIC superiori a **1 µg/ml**. L'unica eccezione a tale *trend* è stata evidenziata nei ceppi isolati in Austria dove la maggior parte dei ceppi testati mostravano una buona suscettibilità al farmaco (Grafico 4). La valutazione delle mutazioni nel gene *parC* ha mostrato differenti sostituzioni amminoacidiche nelle posizioni 78, 80, 81 ed 84 (numerazione basata sull'*Escherichia coli*). Nei Grafici 5 e 6 sono riportati i risultati più evidenti. Infine è interessante far notare che i cambiamenti dimostrati in posizione 79, 81 ed 84 erano tutti presenti in ceppi di origine Israeliana, mentre le variazioni nella posizione 80 non presentano correlazioni con le aree geografiche di isolamento.

CONCLUSIONI

Dai dati qui riportati si può notare come circa il 90% dei ceppi di MS isolati negli ultimi anni in Italia ed in Israele mostrano una minore suscettibilità *in vitro* per l'enrofloxacin.

Risulta essere particolarmente interessante notare che sebbene il *trend* di acquisizione di resistenza alla molecola sembrerebbe essere diffuso tra i vari Stati Europei, gli isolati provenienti dall'Austria sono in totale controtendenza. Tali differenze potrebbero essere ascritte ad un differente utilizzo di fluorochinoloni in tali aree, anche se a nostro parere risulta maggiormente importante l'organizzazione dell'industria avicola in questo Paese e di conseguenza la presenza o meno di aree altamente popolate di avicoli. Infatti si può ipotizzare che in aree ad alta vocazione avicola e ricche di aree densamente popolate quali Italia ed Israele, una disseminazione clonale di ceppi enrofloxacin-resistenti risulti essere molto più probabile rispetto a realtà zootecniche meno popolose come in Austria. Tale dato trova ulteriore conferma nei risultati di genotipizzazione, infatti i genotipi (*vlhA*) degli isolati austriaci risultano essere specifici dell'area.

Dall'analisi delle sequenze e quindi delle relative sostituzioni amminoacidiche in *parC* è **possibile evidenziare una correlazione** tra mutazioni in tale area e valori di MIC. In particolare tutti i ceppi classificati come sensibili all'antibiotico enrofloxacin non hanno mostrato cambiamenti nelle sopraccitate posizioni del gene *parC*. Mentre mutazioni singole o multiple hanno mostrato valori di MIC che permettevano di classificare gli isolati come intermedi o resistenti.

Naturalmente ulteriori studi, focalizzati su isolati di provenienza differente, sono necessari per avvalorare tale affermazione, ma sulla base dei nostri risultati possiamo affermare che l'analisi del gene *parC* può dare indicazioni utili riguardanti la possibile acquisizione di resistenza nei confronti dell'enrofloxacin.

TABELLA 1. *Primers* utilizzati

<i>Primer</i>	Gene target	Sequenza (5'-3')
MS-parC-F	<i>parC</i>	CCAACCGTGCAATTCCTGAT
MS-parC-R	<i>parC</i>	TTATGCGGCGGCATTTCG

Grafico 1. Valori di MIC riscontrati in tutti i ceppi analizzati

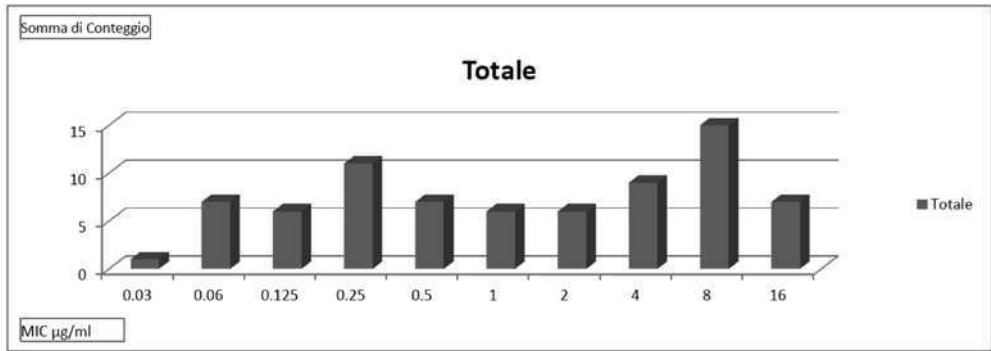


Grafico 2. Valori di MIC riscontrati nei ceppi isolati dal 2009 al 2012

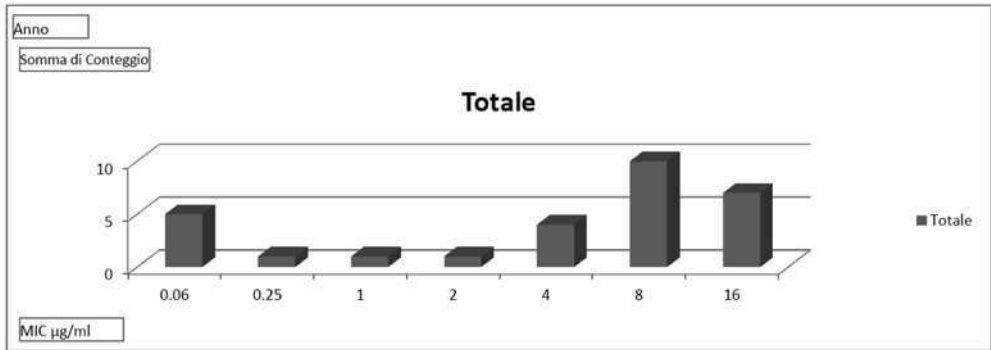


Grafico 3. Valori di MIC riscontrati nei ceppi isolati dal 2009 al 2012 In Italia ed in Israele

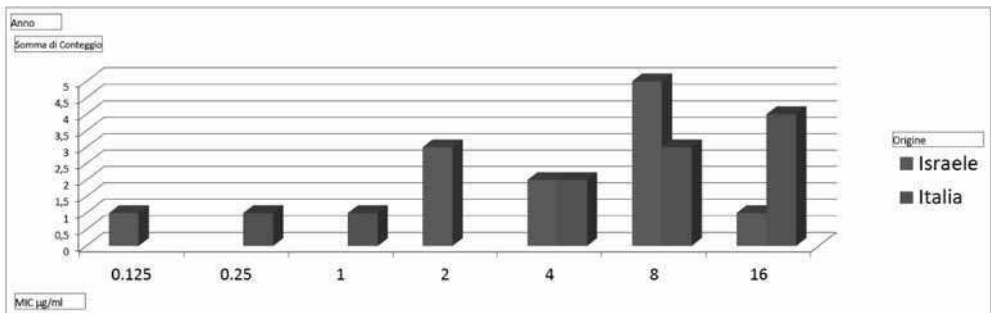


Gráfico 4. Valori di MIC riscontrati nei ceppi isolati dal 2009 al 2012 in Austria

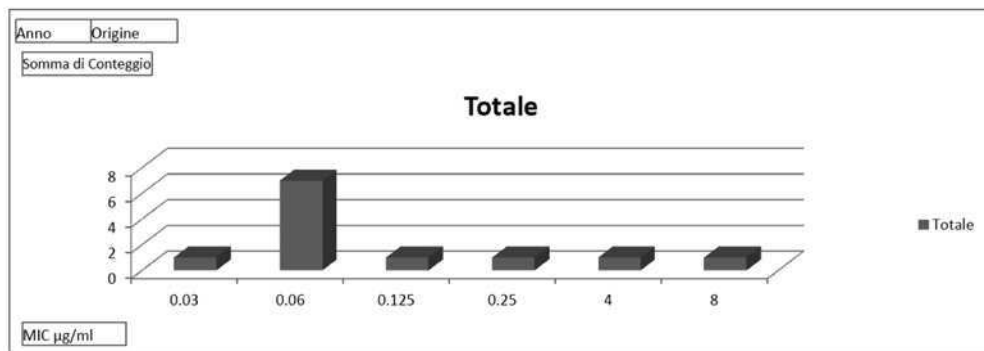


Gráfico 5. Valori di MIC riscontrati nei ceppi con sostituzione in posizione 80 con Ile o Ala

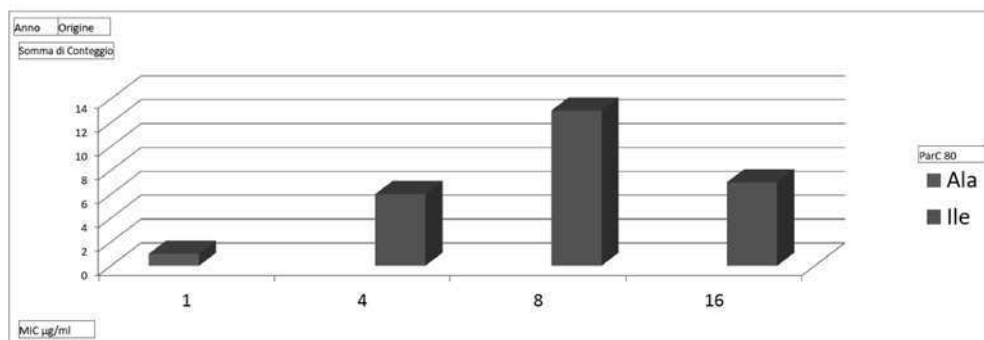
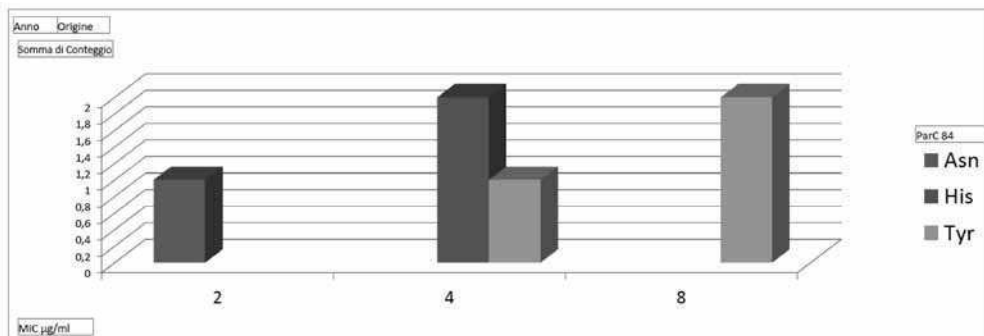


Gráfico 6. Valori di MIC riscontrati nei ceppi con sostituzione in posizione 84 con Asn, His o Tyr



BIBLIOGRAFIA

1. A. Feberwee and W. J. M. Landman. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Control and Eradication in dutch Commercial Poultry. 19th International Congress of the IOM, 15-20 July 2012 Tolouse, France. Pag. 33
2. Dufour-Gesbert F, Dheilly A, Marois C, Kempf I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Vet Microbiol.* 2006 Apr 16;114(1-2):148-54. Epub 2005 Dec 9.
3. Landman WJ, Mevius DJ, Veldman KT, 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 Aug;37(4):415-20.
4. Gobbo F., Flaminio B., Fincato A., Baldasso E., Santone C., Catania S. *Mycoplasma synoviae* e concentrazione minima inibente: valutazione dell'antibiotico suscettibilità in funzione della categoria produttiva e del genotipo (Vlha). 51° CONVEGNO SOCIETA' ITALIANA DI PATOLOGIA AVIARE Salsomaggiore Terme, 11-12 ottobre 2012 –Pag. 281-286. Atti della Società Italiana di Patologia Aviare, 2012
5. Le Carrou, J., A. K. Reinhardt, I. Kempf, and A. V. Gautier-Bouchardon. 2006. Persistence of *Mycoplasma synoviae* in hens after two enrofloxacin treatments and detection of mutations in the *parC* gene. *Vet. Res.* 37:145-154.
6. Hannan P.C.T. (2000) Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.* 31:373-395.
7. Hammond PP, Ramirez 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

Gli Autori ringraziano il Dr. J. Spargser, Institute of Bacteriology, Mycology and Hygiene, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria, per la gentile concessione degli isolati Austriaci.

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."