

LA M.I.C. UTILE STRUMENTO DI MONITORAGGIO DELL'ANTIBIOTICO SENSIBILITÀ. L'ESPERIENZA CON IL *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

Gobbo F.¹, Tonellato F.¹, Moronato M.L.¹, Rizzi S.¹, Catania S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 - Laboratorio di Medicina Aviare, Unità Operativa Micoplasmi, Viale dell'Università, 10, 35020, Legnaro, Padova (PD)

Summary

Mycoplasma gallisepticum (MG) is an important pathogen of the poultry industry causing respiratory disease in chicken, turkey and minor avian species. MG infection is related to high economic losses, not only due to drug-costs for the containment of clinical signs and secondary bacterial infections, but also to high carcass condemnations and worse food conversion rates. Antimicrobial treatment for MG still represents an eligible way to control the pathogen, but in order to guarantee an efficient and rational use of antibiotics pathogens should be tested via ASTs (*Antimicrobial Susceptibility Tests*) before their use in the field. The M.I.C. (*Minimum Inhibitory Concentration*) via microbroth dilution method is considered the gold standard and the only test applicable to these fastidious microorganism. The aim of the present study is to share the MIC results of different MG field strains isolated in the Italian poultry industry. Thus, 49 *Mycoplasma gallisepticum* strains, collected between 2010 and 2017 (25=turkey, 21=chicken, 3=minor avian species) were tested for different drugs using commercial plates with antibiotics on demand. The M.I.C. results of the MG strains tested between 2010-2011 evidenced a profile of resistance to the drug enrofloxacin and signs of multi-drug resistance for macrolides as well as lincomycin. On the other hand, the M.I.C. data (2010-2011) showed the MG susceptibility to tetracyclins, especially to doxycyclin. Basing on these M.I.C. results the laboratory suggested a change in the drug approach to front the infection caused by this pathogen. During the period 2013-2016, the M.I.C. data showed a maintained susceptibility to doxycycline and a gradual shift towards susceptibility values for macrolides expanding the range of antibiotics principles available for MG treatment. Moreover, it highlights how the MIC could be a useful tool for a conscious and effective use of drugs in the field avoiding the development of antibiotic resistance mechanism.

INTRODUZIONE

Mycoplasma gallisepticum (MG) è considerato un importante patogeno respiratorio della specie pollo, tacchino e delle specie avicole definite minori. Nel pollo è responsabile della CRD (*Chronic Respiratory Disease*) e nel tacchino della Sinusite Infraorbitale Infettiva. Nella gallina ovaiole è responsabile di forme respiratorie, che possono essere associate, in funzione della patogenicità del ceppo, anche a importanti seppur temporanei cali della ovodeposizione. Come per altri micoplasmi aviari la trasmissione può avvenire per via orizzontale (tramite contatto diretto od indiretto) e per via verticale, ed una volta instaurata l'infezione, la malattia ha la tendenza alla cronicizzazione. In corso di infezione gli indici di morbilità sono



elevati mentre gli indici di mortalità possono essere variabili (in funzione dell'età dei soggetti e della copresenza di altri agenti infettivi virali o batterici o a specifiche condizioni ambientali, quali elevata densità animale, ventilazione, qualità della lettiera). L'impatto economico è nella maggior parte dei casi associato ad un aumento degli scarti al macello principalmente per le infezioni secondarie alla micoplasmosi (*in primis E. coli*), inoltre gli animali affetti possono presentare un calo del consumo di alimento e un peggioramento dell'indice di conversione alimentare. Ulteriori costi sono relativi al contenimento della forma clinica da MG o a quelli legati all'insorgenza di infezioni batteriche secondarie (*E.coli*, *Ornithobacterium rhinotrachealis*, *Riemerella* spp., etc.). Consci del suo importante ruolo patogeno e delle conseguenti perdite economiche, il controllo di questo patogeno è sempre stato di primaria importanza nei vari settori produttivi industriali e nello specifico nel settore da riproduzione mediante la costituzione ed il mantenimento di gruppi MG-free. Tale pratica gestionale ha sempre rappresentato un punto cardine nella strategia di controllo di questo patogeno e degli altri micoplasmi importanti per l'industria avicola, inoltre l'attuazione di specifici piani nazionali di controllo ed eradicazione nei confronti di MG hanno portato ad una notevole diminuzione della sua prevalenza in diversi paesi europei o extraeuropei. In recenti pubblicazioni da parte di autori appartenenti al continente africano ed asiatico si evince invece come il *Mycoplasma gallisepticum* rappresenti ancora un importante patogeno ad elevato impatto economico-sociale. La strategia di controllo delle micoplasmosi respiratorie può includere, in funzione della situazione epidemiologica e della realtà produttiva o di altri fattori di natura commerciale, la messa in atto di una o più azioni (eradicazione-depopolazione, compartimentalizzazione, biosicurezza, profilassi indiretta-vaccinazione e terapia antibiotica mirata). Data l'importante forma clinica che si può sviluppare nel gruppo affetto e la possibilità di insorgenza di infezioni secondarie, il trattamento antibiotico per MG può essere considerato una prassi consolidata specialmente nel settore da carne. Trovandoci di fronte ad una puntuale e corretta richiesta di un uso razionale del farmaco da parte delle istituzioni nazionali e comunitarie, per il Medico Veterinario risulta di fondamentale importanza conoscere la sensibilità *in vitro* agli antimicrobici dei ceppi patogeni circolanti. Tale approccio è volto a garantire il successo terapeutico e benessere animale nel gruppo affetto, evitare l'utilizzo di farmaci considerati non efficaci sulla base dei risultati degli studi *in vitro* o nello specifico non operare ulteriori pressioni selettive per farmaci o classi di antibiotici che presentano evidenza di diminuita suscettibilità nel tempo e soprattutto per quelli antibiotici considerati "critically important". A tal fine, per avere una stima della sensibilità o della resistenza di un determinato microrganismo agli antimicrobici, si può utilizzare il calcolo della M.I.C. (Minima Concentrazione Inibente), poiché considerata dalla comunità scientifica il *gold-standard* tra gli ASTs (*Antimicrobial Susceptibility Tests*). Inoltre tale metodica è l'unico AST applicabile a microrganismi fastidiosi come i micoplasmi. Il laboratorio di medicina aviaria effettua lo studio di MIC in micoplasmi aviari e di altri settori zootecnici dal 2010, ciò ha consentito l'istituzione di un *database* interno la cui valutazione ha consentito di evidenziare presenza/assenza di efficacia per determinate molecole antibiotiche e di valutare nel tempo eventuali fluttuazioni della sensibilità dei ceppi circolanti nei confronti di specifici antibiotici o classi di antibiotici. Ne consegue che tale *test* laborato-

ristico possa rappresentare un'utile risorsa a supporto delle attività professionali del veterinario di campo. Lo scopo del presente lavoro è quello di condividere l'applicazione di uno strumento dinamico come la M.I.C. per la valutazione e il monitoraggio della antibiotico sensibilità di ceppi patogeni dell'industria avicola italiana e nello specifico di *Mycoplasma gallisepticum*.

Materiali e Metodi

49 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* sono stati coltivati a partire da campioni tracheali di animali industriali presentanti segni clinici o lesioni anatomopatologiche compatibili con micoplasmosi, i ceppi selezionati per tale studio appartengono a diversi anni (2010-2017) e nello specifico 25 sono afferenti alla specie tacchino (51%), 21 alla specie pollo (43%) e 3 ceppi (3%) a specie avicole minori (oca e gallina faraona). Per eseguire il *test*, l'inoculo batterico (10^4 UCC/ML) è stato dispensato in piastre commerciali da 96 pozzetti con antibiotici *on demand* (Merlin Diagnostika®), incubate a $37\pm 1^\circ\text{C}$ fino alla rilevazione di crescita nel pozzetto denominato controllo positivo (inoculo batterico in assenza di sostanze ad azione antimicrobica). Si riporta di seguito gli antibiotici presenti nella piastra con relativi *breakpoints* di sensibilità e resistenza ($\mu\text{g/ML}$) disponibili in letteratura: doxiciclina ($\leq 4, \geq 16$), enrofloxacin ($\leq 0.5, \geq 2$), eritromicina ($\leq 0.5, \geq 8$), florfenicolo ($\leq 2, \geq 8$), lincomicina ($\leq 0.5, \geq 4$), ossitetraciclina ($\leq 4, \geq 16$), spiramicina ($\leq 2, \geq 8$), tiamulina ($\leq 8, \geq 16$), tilmicosina ($\leq 8, \geq 32$) e tilosina ($\leq 1, \geq 4$). I risultati MIC sono stati integrati con i valori di *breakpoints*, permettendo di classificare l'isolato come sensibile, intermedio o resistente all'antibiotico testato e quindi a fornire evidenze *in vitro* dell'efficacia di diverse molecole antibiotiche e quindi supportare il clinico nella scelta del farmaco. Si è proceduto inoltre a calcolare la MIC 50 e MIC 90 dei ceppi, cioè rispettivamente il valore di MIC capace di inibire la crescita del 50% e 90% dei ceppi testati di *M. gallisepticum*.

Risultati

Nei grafici sottostanti si riportano alcuni esempi di valutazione dell'andamento nel tempo (2010-2017) dell'antibiotico sensibilità dei 49 ceppi di MG per alcune molecole antibiotiche testate, classificandoli come sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R).

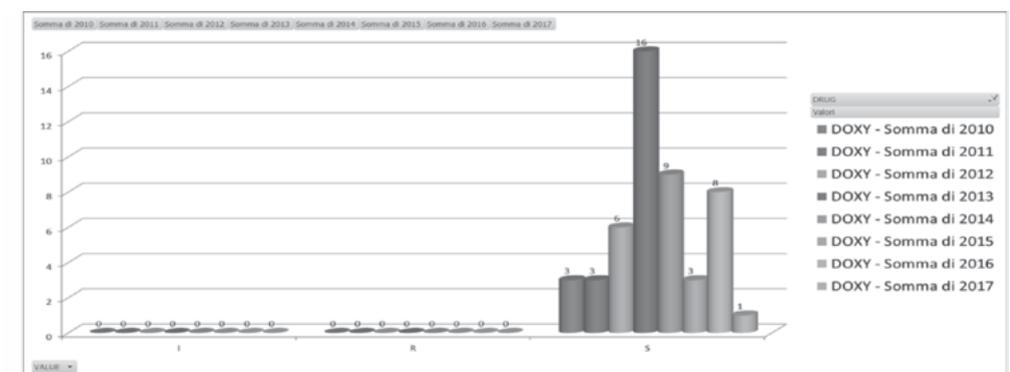


Grafico 1. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico doxiciclina

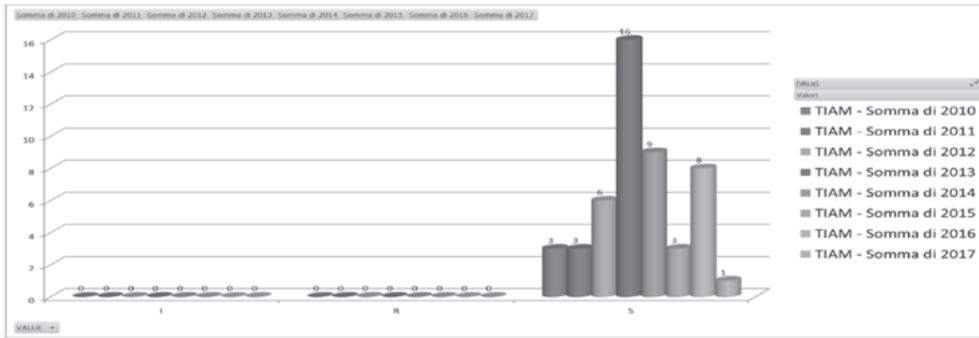


Grafico 2. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico tiamulina

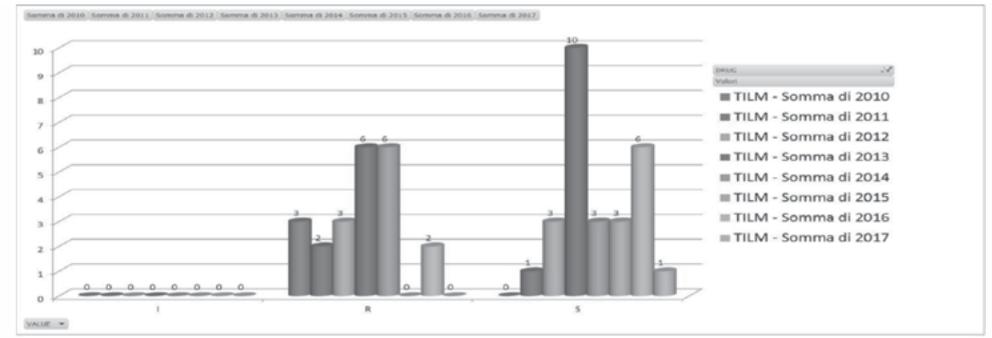


Grafico 5. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico tilmicosina

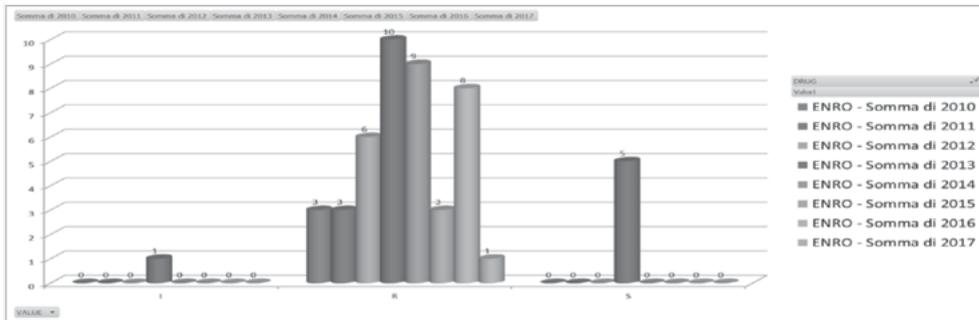


Grafico 3. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico enrofloxacin

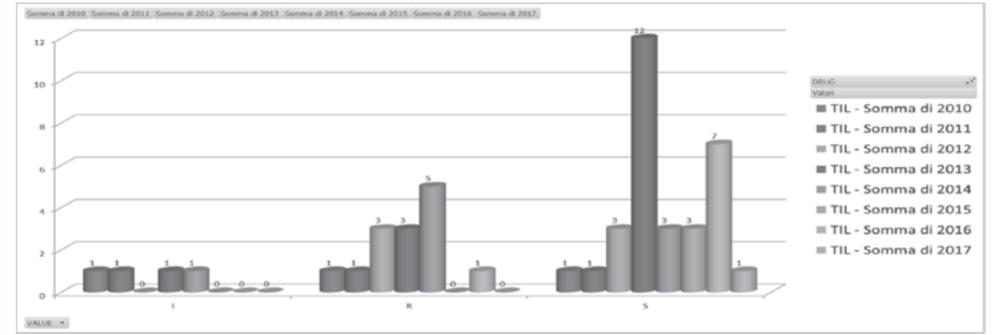


Grafico 6. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico tilosina

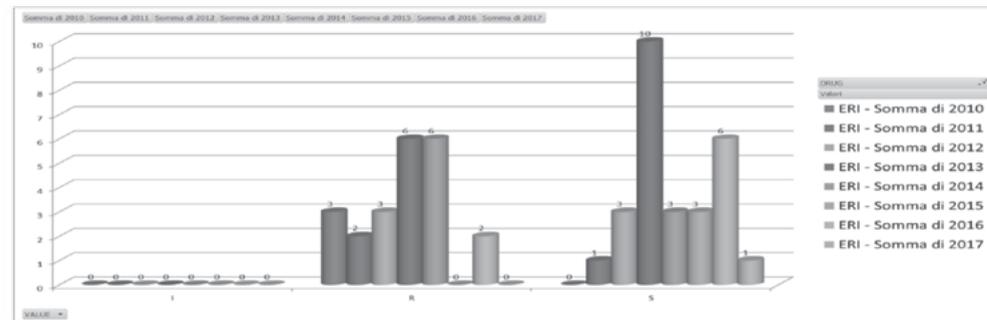


Grafico 4. Classificazione dei 49 ceppi di MG negli anni 2010-2017 per l'antibiotico eritromicina

In tabella 1 si riportano invece i valori di MIC 50 e 90 dei 49 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* utilizzati nello studio per diverse molecole antibiotiche.

Tab. 1 dati di MIC 50 e 90 delle singole molecole antibiotiche dei 49 ceppi di *Mycoplasma gallisepticum* isolati dal 2010-2017

ABT	MIC50 (µg/ML)	MIC90 (µg/ML)
Doxy	0,5	1
Enro	>16	>16
Eri	<0,5	>8
Florf	2	2
Linco	8	>32
Ossi	4	16
Spira	<0,5	16
Tiam	0,03125	0,125
Tilm	0,0625	>32
Til	0,03125	4

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Dai dati prodotti è stato possibile evincere che durante il biennio 2010-2011 le possibilità terapeutiche per MG risultavano essere molto limitate e le uniche molecole che mostravano efficacia *in vitro* appartenevano alla classe delle tetracicline e alla tiamulina, derivato delle pleuromutiline. È interessante notare come molecole considerate storicamente utili per il trattamento di tale patogeno come l'enrofloxacin e i macrolidi, manifestavano elevati valori di MIC. La produzione e diffusione di tali dati congiuntamente ai risultati terapeutici in campo hanno probabilmente stimolato un cambio di mentalità nell'approccio alla terapia antibiotica nei gruppi affetti da *Mycoplasma gallisepticum*, evidenziando come prima scelta terapeutica le tetracicline (e nello specifico la doxiciclina) o la tiamulina e limitando quindi l'utilizzo di farmaci di classi considerate meno efficaci.

È interessante notare come i risultati MIC delle diverse molecole nel tempo ed in particolare nel periodo successivo al 2013, mostrano una mantenuta e buona sensibilità dei ceppi di MG per le tetracicline (nello specifico per la doxiciclina, tale dato è confermato anche dai suoi dati di MIC 50 e 90 presenti in tab. 1, ed una elevata e mantenuta sensibilità per la tiamulina. Risulta interessante evidenziare che a partire dal 2013 la frequenza di isolati o popolazioni microbiche considerate sensibili alla classe dei macrolidi (eritromicina, spiramicina, tilmicosina e tilosina) è risultata sicuramente maggiore mostrando un cambiamento del profilo di farmacosenibilità. Valori inferiori di MIC sono stati evidenziati a partire da tale anno anche per il licosamide testato, seppur classificato ancora come resistente. Contrariamente a quanto evidenziato in tali classi di molecole i dati MIC riguardanti il fluorochinolone testato (enrofloxacin) non hanno mostrato sostanziali cambiamenti in termini di sensibilità o resistenza anche se i valori di MIC sembrano essere leggermente inferiori negli ultimi anni. Naturalmente tali dati dovranno essere confermati dal tempo per chiarire se realmente un progressivo declino dei valori MIC si sta consolidando almeno nel territorio italiano nei ceppi circolanti di *Mycoplasma gallisepticum*, mentre la differente tipologia di comportamento tra macrolidi e fluorochinoloni potrebbe essere spiegata dal diverso meccanismo di resistenza acquisita: mutazione A2058G o A2059G nel dominio V del gene 23S rRNA per i macrolidi, mentre per i fluorochinoloni un meccanismo un po' più complesso in cui la mutazione dei geni DNA girasi e topoisomerasi IV è associata a sostituzioni amminoacidiche nelle proteine GyrA, GyrB e ParC.

Risulta importante sottolineare che i profili di antibiotico sensibilità possono variare in funzione della specie batterica testata, della origine geografica del ceppo e delle diverse categorie produttive. Quindi la raccolta dei dati MIC, finalizzata a generare un *database* storico aziendale o di filiera, dovrebbe essere applicata ai principali micoplasmi aviari di interesse industriale (*M. gallisepticum* e *M. synoviae*), poiché sulla base dei nostri dati le differenze in termini di sensibilità e/o resistenza alle varie classi antibiotiche possono essere anche notevoli.

Concludendo la M.I.C applicata a questi microrganismi e la sua valutazione nel tempo può fornire utili informazioni al campo per la corretta gestione del patogeno, attraverso un utilizzo più razionale del farmaco fondato su dati di laboratorio. Tale approccio congiunto tra libero professionista e laboratorio potrebbe contribuire alla diminuzione del consumo di antibiotici in campo zootecnico e a evitare pressioni selettive, svolgendo quindi un ruolo proattivo nella lotta alla AR. Parallelamente,

tali dati risulterebbero un'utile risorsa per la comunità scientifica come strumento di monitoraggio dello sviluppo di fenomeni di AR in micro e macro aree o in specifiche categorie zootecniche.

BIBLIOGRAFIA

- Raviv Z. And Ley H. (2013). *Mycoplasma gallisepticum* infection. Disease of Poultry 13 th Ed., 877-893
- Feberwee, A., and W. J. M. Landman. The successful implementation of *Mycoplasma gallisepticum* monitoring and control programmes in Dutch commercial poultry: a declining seroincidence during an eleven year period. In: Proc. 19th Congress of the International Organization for Mycoplasma, Toulouse, France. p.153. 2012.
- Landman, W. J. M. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. Avian Pathol. 43:2-8. 2014
- Zanella A., Martino P.A., Pratelli A., Stonfer M., 1998. Development of antibiotic resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro, Avian Pathology, 27:6, 591-596
- Lysnyansky, I. Gerchman, S. Perk, and S. Levisohn Molecular Characterization and Typing of Enrofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Mycoplasma gallisepticum* Avian Diseases Dec 2008 : Vol. 52, Issue 4, pg(s) 685-689 doi: 10.1637/8386-063008-RESNOTE.1
- Irena Gerchman, Sharon Levisohn, Inna Mikula, Lucoa Manso-Silvan and Inna Lysnyansky. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. Veterinary Research 2011, 42:90