

# VALUTAZIONE DELLA MIC (*MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION*) DI CEPPI DI *MYCOPLASMA HYPONEUMONIAE* E *MYCOPLASMA HYORHINIS* ISOLATI NEL SETTORE SUINICOLO ITALIANO

## *EVALUATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF MYCOPLASMA HYPONEUMONIAE E MYCOPLASMA HYORHINIS STRAINS ISOLATED IN THE ITALIAN PIG INDUSTRY*

CATANIA S.<sup>1</sup>, MORONATO M. L.<sup>1</sup>, FLAMINIO B.<sup>1</sup>, USTULIN M.<sup>2</sup>, VIO D.<sup>2</sup>, GOBBO F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)

**Parole chiave:** MIC (Minimum Inhibitory Concentration), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*

**Key words:** MIC (Minimum Inhibitory Concentration), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*

### **Riassunto**

I micoplasmi sono piccoli microrganismi privi di parete cellulare, considerati “fastidious” nella coltivazione *in vitro*, nel settore suinicolo il *Mycoplasma hyopneumoniae* è riconosciuto da tempo come l’agente della polmonite enzootica suina, ma recentemente si sta rivalutando anche il possibile ruolo patogeno del *Mycoplasma hyorhinis*. Il controllo di questi patogeni può avvenire tramite pratiche di profilassi indiretta (vaccinazione) o tramite l’utilizzo di antibiotici per il contenimento della patologia e per garantire il benessere animale. Recentemente la UE richiede al settore zootecnico una razionalizzazione dell’uso degli antibiotici e in particolare di quelli considerati criticamente importanti per l’uomo, inoltre si raccomanda che la scelta dell’antibiotico da utilizzare sia corredato da dati laboratoristici di farmaco-suscettibilità al fine di utilizzare molecole la cui efficacia sia garantita per lo meno da studi *in vitro*. Nel presente contributo si riportano i risultati di uno studio di MIC per un pannello di 10 antibiotici (doxiciclina, enrofloxacin, eritromicina, florfenicolo, lincomicina, ossitettraciclina, spiramicina, tiamulina, tilmicosina e tilosina) di 22 ceppi di *M. hyorhinis* e 9 ceppi di *M. hyopneumoniae* isolati da polmoni di suini da ingrasso nel territorio nazionale (2012-2016) con forma respiratoria ascrivibile a micoplasmosi.

### **Abstract**

Mycoplasmas are small prokaryotic microorganisms, which lack of a cell wall and are considered fastidious in *in vitro* cultivation. In the swine sector, *Mycoplasma hyopneumoniae* is defined as the causative agent of enzootic pneumonia, but recently the role of other species, like *Mycoplasma hyorhinis*, in the pathogenesis of respiratory disease is under debate. The vaccination or the antibiotic treatment are the available tools for the management and control of the disease. Recently, the UE calls for a conscious use of antibiotic molecules, especially those relevant for public human health, and for a rational choice of the best drug, which should be based on *in vitro* studies. In the present study, 22 *Mycoplasma hyorhinis* strains and 9 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains were isolated from swine pneumonic lungs in Italy from 2012 to 2016. All the strains were tested for MIC using a panel of 10 different drugs (doxycycline, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, lincomycin, oxytetracycline, spiramycin, tiamulin, tilmicosin, tylosin) and their analysis are reported in the present study.

## INTRODUZIONE

I micoplasmi sono piccoli microrganismi privi di parete cellulare, considerati “*fastidious*” nella coltivazione *in vitro*. Esistono numerose specie capaci di provocare patologie nei diversi settori zootecnici con considerevoli perdite economiche. Nel settore suinicolo, il *Mycoplasma hyopneumoniae* è riconosciuto da tempo come l’agente della polmonite enzootica suina, il *Mycoplasma hyosynoviae* è considerato responsabile di sinovite ed artrite ed infine è ancora oggetto di discussione il possibile ruolo patogeno del *Mycoplasma hyorhinis*. Al contrario, *M. hyopharyngis* e *M. flocculare* vengono considerati commensali delle prime vie aeree.

Il controllo di questi patogeni è basato sulla prevenzione dell’infezione attraverso l’utilizzo di vaccini (se disponibili) o sul contenimento della patologia attraverso la terapia antibiotica. La difficoltà di crescita di questi microrganismi (e in particolare del *M. hyopneumoniae*) congiuntamente alla richiesta di una diagnosi tempestiva, ha inevitabilmente portato alla diffusione di metodiche di diagnosi diretta di tipo biomolecolare, tralasciando metodi classici come l’isolamento colturale, poiché considerato dispendioso sia in termini di tempo, che di personale. Nonostante ciò, alcuni gruppi di lavoro continuano a studiare come migliorare la crescita *in vitro* di tali microrganismi, tramite l’allestimento di nuovi *media* culturali, consci del valore aggiunto di detenere un isolato batterico vitale (per studi di antibiotico-suscettibilità, genotipizzazione, produzione di vaccini stabulogeni, infezioni sperimentali, etc.). Inoltre, ci troviamo di fronte ad una puntuale e corretta richiesta di un uso razionale del farmaco, quindi per il Medico Veterinario la conoscenza del grado di attività di determinati antimicrobici nei confronti di specifici patogeni circolanti può rappresentare un’utile risorsa a supporto delle sue attività professionali. 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), poiché considerata dalla comunità scientifica il *gold-standard* tra gli ASTs (*Antimicrobial Susceptibility Tests*). La MIC rappresenta “la 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* disponibili (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. Tale metodica, inoltre, è l’unico AST applicabile a microrganismi fastidiosi come i micoplasmi.

Scopo del presente contributo è quello di condividere uno studio sulla valutazione della MIC di 22 ceppi di *M. hyorhinis* e 9 ceppi di *M. hyopneumoniae* isolati da polmoni di suini da ingrasso nel territorio nazionale (2012-2016) con forma respiratoria ascrivibile a micoplasmosi.

## MATERIALI E METODI

I ceppi batterici sono stati coltivati a partire da campioni di polmoni suini presentanti lesioni anatomopatologiche compatibili con micoplasmosi. I ceppi selezionati per tale studio (2012-2016) derivano da campioni di polmone di suino da ingrasso di diverse età e provenienti da allevamenti diversi del territorio nazionale. I campioni sono stati quindi inoculati in terreni selettivi *home made* e commerciali (in formato liquido e agarizzato) e coltivati a +37°C al 5% CO<sub>2</sub> fino alla presenza di crescita riferibile a *Mycoplasma spp.*. L’identificazione è avvenuta tramite metodica 16S-PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e una volta certi della purezza e vitalità dell’isolato si è proceduto alla sua propagazione in 10ML di produzione madre. Avvenuta la crescita si è proceduto a subaliquotare la produzione madre in 10 parti, stoccate a -80°C per almeno 24 ore. Si è poi proceduto alla titolazione della produzione madre utilizzando piastre da 96 pozzetti, il titolo finale espresso in UCC/ML (*Unit Changing Color*) viene calcolato secondo il MPN (*Most Probable Number*). Per eseguire il test, l’inoculo batterico (10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> UCC/ML) è stato dispensato in piastre commerciali da 96 pozzetti con antibiotici *on demand* (Merlin Diagnostika®), incubate a 37±1°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 *breakpoint* di sensibilità e resistenza ( $\mu\text{g}/\text{ML}$ ) disponibili in letteratura: doxiciclina ( $\leq 4, \geq 16$ ), enrofloxacin ( $\leq 0.5, \geq 2$ ), eritromicina ( $\leq 1, \geq 4$ ), florfenicolo ( $\leq 2, \geq 8$ ), lincomicina ( $\leq 1, \geq 8$ ), ossitetraciclina ( $\leq 4, \geq 16$ ), spiramicina ( $\leq 2, \geq 8$ ), tiamulina ( $\leq 8, \geq 16$ ), tilmicosina ( $\leq 16, \geq 32$ ) e tilosina ( $\leq 1, \geq 4$ ). I risultati ottenuti sono stati integrati con i valori di *breakpoint*, permettendo di classificare l'isolato come sensibile, intermedio o resistente all'antibiotico testato. Si è proceduto inoltre a calcolare la MIC50 e MIC90 dei ceppi, cioè rispettivamente il valore di MIC capace di inibire la crescita del 50 % e 90% dei ceppi testati di *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*.

## RISULTATI

Si riporta in Tab. 1 e Tab. 2 i risultati MIC, rispettivamente per 9 ceppi di *M. hyopneumoniae* e 22 ceppi di *M. hyorhinis*

Tab. 1 Risultati MIC ( $\mu\text{g}/\text{ML}$ ) di 9 ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

Tab. 1 MIC results ( $\mu\text{g}/\text{ML}$ ) of 9 isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

| M. HYOPNEUMONIAE |      |      |      |     |       |       |      |       |        |       |         |  |
|------------------|------|------|------|-----|-------|-------|------|-------|--------|-------|---------|--|
| Strain ID        | Year | Doxy | Enro | Eri | Florf | Linco | Ossi | Spira | Tiam   | Tilm  | Til     |  |
| HYOP 1           | 2012 | 1.00 | 0.25 | >8  | <0.5  | <0.5  | 1.00 | 2.00  | 0.25   | 8.00  | 0.50000 |  |
| HYOP 2           | 2012 | 0.50 | 0.50 | >8  | <0.5  | <0.5  | 1.00 | 1.00  | 1.00   | 16.00 | 0.125   |  |
| HYOP 3           | 2012 | 0.25 | 1.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | <0.5 | <0.5  | 0.0625 | 1.00  | 0.03125 |  |
| HYOP 4           | 2015 | 2.00 | 2.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 2.00 | <0.5  | 0.25   | 2.00  | 0.06    |  |
| HYOP 5           | 2015 | 0.50 | 2.00 | >8  | 1.00  | <0.5  | 1.00 | 1.00  | 0.50   | 4.00  | 0.125   |  |
| HYOP 6           | 2016 | 0.50 | 2.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 1.00 | <0.5  | 0.25   | 1.00  | 0.0625  |  |
| HYOP 7           | 2016 | 1.00 | 2.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 1.00 | <0.5  | 0.25   | 2.00  | 0.0625  |  |
| HYOP 8           | 2016 | 0.25 | 1.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | <0.5 | <0.5  | 0.25   | 1.00  | 0.0625  |  |
| HYOP 9           | 2016 | 1.00 | 2.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 1.00 | <0.5  | 0.125  | 1.00  | 0.0625  |  |

Tab.2 Risultati MIC ( $\mu\text{g}/\text{ML}$ ) di 22 ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* (2012-2016)

Tab.2 MIC results ( $\mu\text{g}/\text{ML}$ ) of 22 isolates of *Mycoplasma hyorhinis* (2012-2016)

| M. HYORHINIS |      |        |      |     |       |       |       |       |       |       |        |  |
|--------------|------|--------|------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--|
| Strain ID    | Year | Doxy   | Enro | Eri | Florf | Linco | Ossi  | Spira | Tiam  | Tilm  | Til    |  |
| HYORH 1      | 2012 | 0.25   | 0.50 | >8  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | 2.00  | 0.25  | 2.00  | 0.25   |  |
| HYORH 2      | 2012 | <0.125 | 1.00 | >8  | <0.5  | >32   | <0.5  | 4.00  | 0.25  | >32   | 16.00  |  |
| HYORH 3      | 2012 | 1.00   | 4.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 4.00  | <0.5  | 0.125 | 16.00 | 0.25   |  |
| HYORH 4      | 2012 | 1.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | >32   | 2.00  | >16   | 0.50  | >32   | >32    |  |
| HYORH 5      | 2012 | 0.50   | 4.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | 0.125 | 2.00  | 0.0625 |  |
| HYORH 6      | 2012 | 0.50   | 2.00 | >8  | <0.5  | >32   | <0.5  | 8.00  | 0.125 | >32   | 32.00  |  |
| HYORH 7      | 2012 | 2.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | >32   | 2.00  | >16   | 0.50  | >32   | >32    |  |
| HYORH 8      | 2012 | 8.00   | 4.00 | >8  | <0.5  | >32   | 8.00  | 2.00  | 0.25  | >32   | 32.00  |  |
| HYORH 9      | 2012 | 1.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | >32   | 2.00  | >16   | 0.50  | >32   | >32    |  |
| HYORH 10     | 2013 | <0.125 | 8.00 | >8  | <0.5  | >32   | <0.5  | 16.00 | 0.25  | >32   | >32    |  |
| HYORH 11     | 2014 | 2.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | >32   | 4.00  | 16.00 | 0.250 | >32   | 32.00  |  |
| HYORH 12     | 2015 | 1.00   | 4.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 2.00  | <0.5  | 0.250 | 8.00  | 0.50   |  |
| HYORH 13     | 2015 | 1.00   | 4.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | 0.250 | 4.00  | 0.0625 |  |
| HYORH 14     | 2015 | 0.50   | 2.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 1.00  | <0.5  | 0.250 | 16.00 | 0.25   |  |
| HYORH 15     | 2015 | <0.125 | 4.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | <0.5  | 0.250 | 4.00  | 0.25   |  |
| HYORH 16     | 2015 | 4.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | <0.5  | 4.00  | <0.5  | 1.000 | 16.00 | 0.50   |  |
| HYORH 17     | 2015 | 2.00   | 4.00 | >8  | 2.00  | >32   | 4.00  | >16   | 1.000 | >32   | >32    |  |
| HYORH 18     | 2015 | 16.00  | 4.00 | >8  | 2.00  | >32   | 16.00 | 16.00 | 0.500 | >32   | >32    |  |
| HYORH 19     | 2015 | 1.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | <0.5  | 2.00  | <0.5  | 0.25  | 4.00  | 0.25   |  |
| HYORH 20     | 2015 | 1.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | <0.5  | 4.00  | <0.5  | 0.25  | 4.00  | 0.50   |  |
| HYORH 21     | 2015 | 1.00   | 2.00 | >8  | <0.5  | <0.5  | 4.00  | <0.5  | 0.13  | 4.00  | 0.25   |  |
| HYORH 22     | 2016 | 2.00   | 4.00 | >8  | 1.00  | <0.5  | 4.00  | <0.5  | 0.25  | 8.00  | 0.50   |  |

Si riportano in Tab. 3 e 4 i valori di MIC50 e MIC90 dei ceppi testati rispettivamente di *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinitis* per le diverse molecole antibiotiche.

Tab. 3 MIC50 e 90(µg/ML) di 9 ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

Tab. 3 MIC50 and 90 (µg/ML) of 9 isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

| ABT   | MIC50 (µg/ML) | MIC90 (µg/ML) |
|-------|---------------|---------------|
| Doxy  | 0,5           | 1             |
| Enro  | 1             | 2             |
| Eri   | >8            | >8            |
| Florf | <0,5          | <0,5          |
| Linco | <0,5          | <0,5          |
| Ossi  | 1             | 1             |
| Spira | <0,5          | 1             |
| Tiam  | 0,25          | 0,5           |
| Tilm  | 2             | 8             |
| Til   | 0,0625        | 0,125         |

Tab.4 Risultati MIC50 e 90 (µg/ML) di 22 ceppi di *Mycoplasma hyorhinitis* (2012-2016)

Tab.4 MIC50 and 90 (µg/ML) of 22 isolates of *Mycoplasma hyorhinitis* (2012-2016)

| ABT   | MIC50 (µg/ML) | MIC90 (µg/ML) |
|-------|---------------|---------------|
| Doxy  | 1             | 4             |
| Enro  | 4             | 8             |
| Eri   | >8            | >8            |
| Florf | 0,5           | 1             |
| Linco | 0,5           | 32            |
| Ossi  | 2             | 4             |
| Spira | 0,5           | 16            |
| Tiam  | 0,25          | 0,5           |
| Tilm  | 16            | 32            |
| Til   | 0,5           | 32            |

## DISCUSSIONE

I 9 ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* hanno mostrato una elevata sensibilità al florfenicolo, lincomicina, spiramicina tilosina, tiamulina, tilmicosina, una buona sensibilità alla ossitetraciclina e doxiciclina, diminuita suscettibilità all'enrofloxacin e completa resistenza nei confronti del macrolide eritromicina. La analisi della MIC50 e MIC90 (Tab.3), seppur con un numero ridotto di ceppi, supporta tali dati ed evidenzia popolazioni microbiche con ridotta suscettibilità per alcune molecole testate.

I 22 ceppi di *Mycoplasma hyorhinitis* hanno mostrato una elevata sensibilità alla tiamulina e florfenicolo, una buona sensibilità alla ossitetraciclina e doxiciclina. Per gli antibiotici

lincomicina, spiramicina e tilosina si osserva una suscettibilità variabile con popolazioni altamente sensibili o altamente resistenti. Per l'antibiotico enrofloxacin 20 ceppi presentano valori di resistenza e tutti i ceppi risultano resistenti alla eritromicina, si rileva una diminuita suscettibilità al macrolide tilmicosina con 10 ceppi che presentano valori di MIC superiori al *breakpoint* di resistenza (32µg/ML).

## CONCLUSIONI

I risultati MIC consentono di mettere in evidenza buoni margini terapeutici per il *M. hyopneumoniae* e seppur con alcune differenze anche per il *Mycoplasma hyorhinis*. Il presente studio dimostra come sia possibile valutare l'antibiotico suscettibilità anche di microrganismi considerati fastidiosi e la cui terapia spesso è basata sull'utilizzo di antibiotici considerati criticamente importanti.

Consci che per alcuni microrganismi (come il *M. hyopneumoniae*) il dato MIC non possa essere fruibile tempestivamente per la terapia dello specifico gruppo infetto, rilanciamo l'idea di MIC intesa come “*strumento dinamico*” e quindi non focalizzato solamente su un caso clinico. Infatti, la raccolta dei dati MIC finalizzata a generare un *database* storico, aziendale o di filiera, fornirà utili informazioni per la corretta gestione della patologia attraverso un utilizzo più razionale del farmaco fondato su dati di laboratorio. Tale approccio congiunto tra libero professionista e laboratorio potrebbe aiutare ad evitare pressioni selettive in campo, 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 antibiotico resistenza in micro o macro aree.

## BIBLIOGRAFIA

- Hannan PC., (2000) “Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species”. Vet. Res. 31, 373–395.
- Fincato A., Ustulin M., Santone C., Moronato M.L., Vio D., Catania S. (2016) “Evaluation of different methods for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*”. XVII Congresso SIDILV, 28-30 settembre 2016, Pacengo Lazise (VR), 202-203.
- Catania S., Ruben S. Rosales, Ustulin M., Fincato A., Gobbo F., Vio D.. (2015) “Diagnosi diretta mediante isolamento ed identificazione di *Mycoplasma* spp. nel settore suinicolo, un'ulteriore possibilità diagnostica”. XLI Meeting annuale della società italiana di patologia ed allevamento dei suini. 19-20 Marzo 2015, Montichiari (BS), 249-254.
- Flaminio B, Fincato A., Sturaro A., Santone C., Gobbo F., Catania S.. (2014) “Minimum Inhibitory Concentration of mycoplasma species: a chance for a practitioner, a challenge for the laboratorist”. 3rd EAVLD Congress, Pisa, 12-15 Ottobre 2014, 36