

Protocollo di campionamento e consegna al laboratorio per l'isolamento culturale di specie appartenenti al genere *Mycoplasma* spp. nel pollame

Introduzione

I microrganismi appartenenti al genere *Mycoplasma* spp. sono **microrganismi opportunisti/patogeni del mondo vegetale, invertebrati inferiori (insetti) e vertebrati** (pesci, rettili, anfibi, uccelli, mammiferi e uomo). Sono privi di parete batterica delle dimensioni di 0.2-0.5 μm e sono considerati "fastidiosi" nella crescita *in vitro*, poiché richiedono terreni selettivi. Presentano inoltre una dinamica di crescita piuttosto lenta se comparati ai comuni batteri.

L'**isolamento culturale in ambito avicolo è utilizzato principalmente per confermare specifici sospetti diagnostici**. Questa metodica risulta essere unica, in quanto permette l'evidenziazione di germi vitali e ne garantisce il loro mantenimento.

Il ceppo vitale risulta utile per ulteriori ed eventuali approfondimenti diagnostici, quali ad esempio:

- lo studio della sensibilità agli antibiotici mediante metodica MIC (Concentrazione Minima Inibente);
- il possibile utilizzo del ceppo per infezioni sperimentali;
- per altre attività, come la genotipizzazione.

Infine l'isolamento culturale permette anche di **evidenziare specie di micoplasmi considerate minori**, per le quali non è sempre possibile avere metodiche biomolecolari a target definito.

Sulla base di queste brevi considerazioni segnaliamo alcuni utili e pratici accorgimenti che possono essere applicati al fine di aumentare le probabilità di isolamento.

Quando campionare

Il prelievo sarà effettuato su animali supposti infetti preferibilmente durante la fase acuta della malattia (entro 30 giorni dalla comparsa dei sintomi).

Sarebbe opportuno che gli animali sottoposti a campionamento **non abbiano subito trattamenti antibiotici** con farmaci efficaci nei confronti dei micoplasmi, come ad esempio macrolidi, fluorochinoloni, tetracicline ed aminoglicosidi.

Cosa prelevare

Il tampone tracheale è considerato il miglior campione per la maggior parte delle specie di micoplasmi aviari coltivabili.

Nel caso di **sospetto di *Mycoplasma iowae* e *Mycoplasma meleagridis*** il tampone cloacale o il tampone del fallo risultano essere i campioni di elezione.

In **animali deceduti** l'isolamento colturale può essere effettuato mediante prelievo con tampone su differenti matrici quali polmoni, sacchi aerei, ovidutto, articolazioni, intestino ect.

Nel caso di **diminuzione della schiudibilità** riferibile a micoplasmosi è preferibile il campionamento del sacco vitellino nell'ultimo terzo di incubazione (ad esempio dopo il 15° giorno di incubazione nel pollo e il 20° giorno nel tacchino).

In caso di particolari richieste si prega di **contattare direttamente il laboratorio** al fine di trovare soluzioni *ad hoc* per specifiche condizioni o problematiche.

Quanti campioni prelevare

In un **gruppo sospetto in fase acuta e sintomatico** il prelievo di 10 tamponi tracheali da 10 differenti animali è considerato sufficiente a permettere un isolamento del ceppo coinvolto.

Durante la **fase cronica** è consigliato incrementare la numerosità campionaria fino a 30 animali, anche se in tali casi uno screening preliminare con test biomolecolari può sicuramente aiutarci nella decisione e rendere quindi più efficiente il processo.

In caso di **diminuzione della schiudibilità riferibile a micoplasmosi** (ad esempio *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma iowae*), almeno 60 uova embrionate (preferibilmente nella fase finale di sviluppo) possono essere sufficienti a evidenziare il patogeno. Al fine di ottimizzare il processo diagnostico, questi campioni potrebbero essere preliminarmente testati attraverso metodiche biomolecolari; quindi testati mediante metodica microbiologica solamente i campioni risultati positivi.

In caso di particolari richieste si prega di **contattare direttamente il laboratorio** al fine di trovare soluzioni *ad hoc* per specifiche condizioni o problematiche.

Come campionare

La procedura di campionamento rappresenta essere **un fattore critico e cruciale dell'intera procedura di isolamento**. Infatti la principale causa di insuccesso nell'isolamento micoplasmi può essere considerata la contaminazione batterica. Ne consegue che il momento del prelievo deve essere considerato il primo e importante *step* del processo analitico.

In particolar modo occorre:

- utilizzare **tamponi di piccole dimensioni** al fine di facilitare l'ingresso in trachea;
- **non toccare con il tampone il fondo della bocca**, o le aree in prossimità dell'apertura della trachea;
- **eliminare ogni tampone potenzialmente inquinato**, qualsiasi sia il motivo.

È opportuno ricordare che nella trachea sono già presenti batteri contaminanti; non occorre quindi aggiungerne degli altri provenienti dalla cavità buccale.

Nel caso di **prelievi in carcasse** i differenti campioni possono essere prelevati dopo una attenta disinfezione della superficie (cauterizzazione o altro metodo equivalente). Ricordiamo che i micoplasmi vivono preferibilmente nella superficie epiteliale, quindi il tampone dovrà essere effettuato preferibilmente su tale matrice.

Una volta effettuato un corretto campionamento **il tampone verrà stemperato energicamente per circa 5 secondi nel brodo di trasporto (fornito dal laboratorio)**, precedentemente scongelato per un massimo di 5 tamponi/animali per provetta.

Il **medium di trasporto**, una volta inoculato con il/i tampone/i, dovrà essere riposto nel suo contenitore e identificato al fine di permettere una correlazione tra il tampone ed il *medium* di trasporto inoculato.

Si raccomanda di non lasciare il tampone all'interno del medium di trasporto.

Come conservare e inviare i campioni

Una volta che i campioni sono stati prelevati, **il medium inoculato (massimo 5 tamponi per provetta) verrà prontamente refrigerato (+4°C)** al fine di evitare possibili crescite di batteri contaminanti durante il trasporto.

I campioni mantenuti refrigerati dovranno pervenire al laboratorio preferibilmente entro 24 ore dal prelievo. In caso contrario occorrerà procedere prontamente al congelamento a -20°C, temperatura che occorrerà mantenere fino alla consegna al laboratorio.

Si prega di porre particolare attenzione nel confezionamento, al fine di ridurre al minimo possibili sbalzi termici con conseguente scongelamento della provetta e possibile compromissione dell'isolamento.

In caso di particolari richieste si prega di **contattare direttamente il laboratorio** al fine di trovare soluzioni *ad hoc* per specifiche condizioni o problematiche.

Come conservare e inviare eventuali ceppi isolati

I ceppi di micoplasmi isolati **possono essere liofilizzati e mantenuti a +4°C per il periodo del trasporto**. In alternativa altre soluzioni possono essere valutate anche sulla base delle condizioni specifiche dell'isolato stesso.

Vista la particolare tipologia di richiesta, in tale caso è sempre consigliato **contattare preliminarmente il laboratorio** al fine di trovare soluzioni *ad hoc*.

Contatti

Salvatore Catania

SCT1 - Laboratorio di medicina aviaria
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Tel.: +39 045 500285; +39 049 8084192
E-mail: scatania@izsvenezie.it