

COMUNICAZIONE 19

APPLICAZIONE DEL METODO "POLYMERASE CHAIN REACTION" ALLA DIAGNOSI DI MYCOPLASMA GALLISEPTICUM E DI MYCOPLASMA SYNOVIAE

F. PAGANELLI, P. MASSI, G. TOSI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, esame colturale, polymerase chain reaction

Application of method "Polymerase chain reaction" for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, mycoplasma cultures, polymerase chain reaction

Summary: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) are pathogenic mycoplasmas that affect commercial poultry. MG causes chronic respiratory disease in chickens and sinusitis in turkeys, MS causes upper respiratory infections and synovitis in chickens and turkeys. The diagnosis of these pathogenic avian mycoplasmas has typically been carried out by serological procedures and isolation of the organism. Species-specific polymerase chain reaction (PCR) procedures are effective and rapid methods for detecting MG and MS.

Correspondence: Francesca Paganelli, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Sezione di Forlì- Via Marchini 1- 47100 Forlì. Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Nel pollame prevalgono due specie di micoplasmi, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS). MG è responsabile di sindromi respiratorie a carattere cronico nel pollo e nel tacchino spesso associate, nei soggetti in ovodeposizione, a cali di produzione, alterazioni della qualità del guscio e mortalità embrionale. La sinovite infettiva (sostenuta da MS) è una malattia contagiosa sistemica che coinvolge le membrane sinoviali e produce artrosinoviti e bursiti. MS è inoltre coinvolto nell'eziologia di sindromi respiratorie nel pollo da carne (4). I metodi tradizionali di diagnosi sono basati sull'isolamento del micoplasma e sul riscontro di anticorpi specifici con tecniche sierologiche. La non specificità delle reazioni sierologiche, la cross-reattività fra MG e MS e la necessità di circa 20 giorni per l'isolamento del microrganismo non garantiscono sempre il livello di accuratezza necessario (3). L'applicazione della *polymerase chain reaction* (PCR) si è invece dimostrata un metodo sensibile e specifico. A tale proposito abbiamo voluto valutare l'utilizzo di questa tecnica a scopo diagnostico per MG e MS.

Materiali e Metodi

Preparazione del campione

I campioni di partenza erano costituiti da tamponi tracheali, essudato presente in trachea, nei seni nasali, nelle congiuntive e da liquido sinoviale.

L'estrazione del DNA è stata eseguita su 1 ml di campione diluito con PBS sterile, centrifugato a 14,000 x g per 10 minuti e ripetuta l'operazione di lavaggio del campione. Il pellet è stato risospeso in 70 µl di 0,1% DEPC (diethylPyrocarbonate; Invitrogen®, USA) water.

Il campione è stato incubato a 120°C per 10 minuti e poi a -20°C per altri 10 minuti. Centrifugato ad elevata velocità e trasferito il sovrantante contenente il DNA totale in una eppendorf nuclease free.

Il DNA estratto è stato valutato quantitativamente tramite uno spettrofotometro a 260 nm e a 280nm. Il campione è stato conservato a -20°C.

Polymerase chain reaction

Il protocollo di PCR utilizzato è quello descritto da Lauerman *et al* (2). Il campione (100-2000 ng/5µl) è

stato aggiunto ai reagenti necessari che fanno parte della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA).

Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il primer "forward" MG-F+ e il primer "reverse" MG-R- per MG e i primers MS-F+ e MS-R- per MS (2) (Tabella1).

Tabella 1: Sequenza dei primers.

Table 1: Sequence of primers.

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA (5'-3')
MG-F	GAGCTAATCTGTAAGTTGGTC
MG-R	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC
MS-F	GACAAGCAAATAGTATCA
MS-R	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA

La reazione avviene in un termociclatore automatizzato (Gene Cyclo™, Bio-Rad®, USA) secondo il seguente profilo di amplificazione: 5 minuti a 94°C (hot start) seguito da 35 cicli costituiti da 3 step: 94°C per 30 secondi (denaturazione), 55°C per 30 secondi (annealing), 72°C per 1 minuto (estensione); al termine dei cicli 1 minuto a 72°C per eventuali estensioni.

Il prodotto amplificato viene sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio 1,7%, colorazione con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

MG presenta un frammento di 185 bp mentre MS di 214bp; tutti i campioni sono confrontati con un campione sicuramente positivo e uno negativo, sempre rapportandosi al marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fremontas®, Lithuania).

Esame colturale

Per l'isolamento dei micoplasmi viene utilizzato un terreno agar Frey. Le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera arricchita con il 10% di CO₂ e sono state osservate quotidianamente allo stereomicroscopio.

Dalle colonie sviluppatesi è stata allestita una coltura pura mediante passaggi su terreno solido.

La tipizzazione dei ceppi isolati è stata eseguita attraverso la metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) e mediante l'allestimento delle seguenti prove

biochimiche: fermentazione del glucosio, idrolisi dell'arginina, riduzione del terazolio (sia in anaerobiosi che in aerobiosi) e produzione di "film and spot".

E' stata inoltre valutata l'attività emoagglutinante nei confronti di globuli rossi di pollo (1).

Sono state inoltre allestite prove sierologiche nei confronti di MG e MS mediante l'utilizzo dei seguenti tests: sieroaagglutinazione rapida (SAR), ELISA (KPL®, USA) e inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

Risultati

Da gennaio 2002 a Luglio 2002 sono stati eseguiti 331 esami con la tecnica di PCR sia per MG che per MS: 210 campioni sono risultati negativi per entrambi i micoplasmi, 108 positivi per MG e 13 positivi per MS.

Per 90 di questi campioni è stato possibile eseguire anche esame colturale tradizionale per l'isolamento dei micoplasmi; i risultati di questa doppia ricerca sono riportati in tabella 2.

Tabella 2: Risultati dell'utilizzo della PCR e dell'esame colturale per l'identificazione dell'MG e dell'MS.

Table 2: Detection of MG and MS by PCR and mycoplasma cultures.

CAMPIONI	PCR	ESAME COLTURALE
NEGATIVO (%)	44 (48.8)	70 (77.7)
MG (%)	41 (45.5)	9 (10)
MS (%)	5 (5.5)	/
SVILUPPO DI FLORA MICROBICA (%)	/	11 (12.2)

Discussione

Questi primi dati hanno messo in evidenza una maggiore sensibilità e specificità della PCR rispetto all'utilizzo dell'esame colturale. Con la tecnica di amplificazione del DNA è possibile identificare la presenza di microrganismi anche se in tracce. Un altro vantaggio non indifferente dal punto di vista dell'efficienza diagnostica è il tempo: l'esame colturale richiede circa 20 gg. rispetto ai 2 gg. necessari con la metodica di amplificazione del DNA. Inoltre si è

evidenziata una maggior sensibilità per MS, difficile da isolare tramite l'esame colturale.

Nella microbiologia classica si prevede che le cellule microbiche accettino di replicarsi nei terreni di coltura in cui vengono piastrate; invece il DNA è indipendente dal fatto che il micorganismo sia in grado di replicarsi nel mezzo di coltura. Inoltre anche se si avesse a che fare con cellule dormienti, con metabolismo rallentato che non permetterebbero la replicazione su terreno di coltura, questo non avrebbe niente a che vedere con il sistema di monitoraggio basato sulla PCR.

Con cellule morte o addirittura solo con il cromosoma libero nella cellula si riesce bene a monitorare con la PCR.

Spesso con l'esame colturale non è possibile isolare il micoplasma per la presenza di infezioni secondarie che inficiano la prova, invece con la PCR questo problema non sussiste.

Questo sistema diagnostico, basato sull'amplificazione molecolare si è rilevato altamente sensibile e significativo per una diagnosi più veloce sia di MG che di MS.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il personale tecnico della Sezione IZSLER di Forlì.

Bibliografia

1. Kleven S.H., Yoder H.W. (1989) "Mycoplasmosis" in: American Association of Avian pathologists. Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3th edition. Kendal/Hunt publishing company, 57-62.
2. Laueran L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shan S.M., Saten V.L. (1993) "Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, 37, 829-834.
3. Maricamen G., Jackwood M.W., Head M., Levisohn S. Kleven S.H. (1996) "Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplication products". *J Vet Diagn. Invest.*, 8, 56-63.
4. Stipkovits L., Kempf I. (1996) "Mycoplasmosis in Poultry". *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 15, 1495-1525.