

## **ANALISI DEI CEPPI CIRCOLANTI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* MEDIANTE L'UTILIZZO DI METODICHE BIOMOLECOLARI.**

Catania S., Battanolli G., Baldasso E., Fincato A., Rodio S., Iob L.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy [scatania@izsvenezie.it](mailto:scatania@izsvenezie.it)*

### **Summary**

*Mycoplasma synoviae* (MS) is considered an important cause of economic loss in the poultry industry. Respiratory and articular diseases are usually associated to MS infection causing high condemnation rates. The biomolecular methods permit to study some specific genes in order to evidence specific change in the DNA sequencing. Recently, some Authors report a classification of MS based on the sequencing of *vlhA* gene that encoded for the variable lipoprotein VlhA, an abundant immunodominant surface lipoprotein [5]. This protein is characterized by an N-terminal conserved region existing in single copy of which sequence shows high variability among strains. Gene sequence contains tandem repeats that encode proline-rich repeats (PRR) and also a region that is highly polymorphic (RIII) [1]. The aim of this report is to study the *vlhA* genotype of *Mycoplasma synoviae* recently isolated in our lab. A total of 338 MS were submitted for the *vlhA* study and we obtain 303 sequences. Our results showed an high presence of genotype D and F in the poultry industry.

### **INTRODUZIONE**

Il *Mycoplasma synoviae* (MS) rappresenta uno dei più importanti micoplasmi in ambito avicolo. Il suo ruolo patogeno è principalmente localizzato nel settore da carne dove causa importanti danni economici, dovuti ad un incremento di scarti al macello ed un decremento degli indici di conversione. Inoltre recentemente l'MS è stato correlato, in diverse nazioni inclusa l'Italia, ad una specifica alterazione del polo apicale del guscio nella gallina ovaiole [1,3].

Lo studio della classificazione dei patogeni, attraverso differenti metodologie, ha permesso a seguito di correlati studi epidemiologici di evidenziare specifici tipi o sottotipi responsabili di forme cliniche più o meno evidenti. Anche se nel settore micoplasmi non siamo giunti a tali traguardi la possibilità di distinzione dei genotipi rappresenta un ottimo punto di partenza. In particolare recentemente la lesione apicale del guscio è stata relazionata principalmente ad uno specifico genotipo [2] permettendo di chiarire alcune discrepanze dovute principalmente ad una elevata incidenza di gruppi di ovaiole MS positivi contro una minore prevalenza di gruppi produttori di uova alterate.

Tale esempio ha sempre più stimolato la nostra attività in questo settore focalizzando la nostra attenzione nella studio dei differenti genotipi attualmente circolanti. Scopo del presente lavoro è quello di studiare i differenti genotipi di MS circolanti nel territorio nazionale.

### **MATERIALI E METODI**

338 estratti di DNA sono stati sottoposti a successiva PCR, seguendo le indicazioni

descritte da Hammond *et al.* [4] con alcune modifiche.

Al termine della reazione di PCR, i prodotti sono stati visualizzati con corsa in gel di acrilamide al 7% e successivamente inviati al sequenziamento.

Le sequenze prodotte, in totale 303, sono state allineate con il software MEGA® utilizzando come riferimento le sequenze elencate da Hammond *et al.*[4]. L'allineamento è avvenuto in due momenti: classificazione del genotipo tramite allineamento del PRR, valutazione della lunghezza e dell'identità rispetto alle sequenze già presenti, infine solo per i campioni risultati di tipo C, è stato assegnato il sottotipo controllando l'identità della sequenza RIII rispetto a quelle già postate.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Su di un totale di 338 estratti positivi ad MS provenienti dal territorio italiano sono stati sequenziati ben 303 campioni, tale differenza è principalmente dovuta al fatto che in alcuni casi non è stato possibile ottenere una sequenza valida a causa della qualità del DNA prodotto mentre in altri casi la presenza di differenti bande, e quindi possibilmente di due differenti ceppi, non ha permesso il sequenziamento.

Di queste, alcune per un totale di 127 sequenze risultavano appartenere ai medesimi allevamenti e sono state utilizzate al fine di valutare il possibile mantenimento del genotipo all'interno dell'insediamento. Dai dati da noi ottenuti in tutti gli allevamenti testati, ad eccezione degli insediamenti *multi-age*, il genotipo ritrovato risulta essere sempre il medesimo all'interno del singolo capannone e negli altri capannoni, anche con tempistica differente. Inoltre in laboratorio abbiamo eseguito alcune prove con passaggi seriali dimostrando il mantenimento del medesimo genotipo.

I rimanenti 176 campioni corrispondono a differenti insediamenti zootecnici nei quali abbiamo dimostrato la presenza di diversi genotipi quali C, D, E, F, G, H. Il genotipo maggiormente frequente è risultato essere il D con una percentuale del 44% seguito dal genotipo F (40%) ed infine il C (23%), i rimanenti tre genotipi presentano percentuali dell'1% ciascuno.

All'interno della varie categorie produttive si sono notate alcune differenze riguardati la presenza dei vari genotipi in particolare sembra che il genotipo F sia maggiormente presente nel settore da ingrasso ed ovaioia mentre il settore riproduttore presenti una maggiore presenza del genotipo D.

Tali dati sono di sicuro stimolo per ulteriori studi volti ad individuare la prevalenza dei vari genotipi nelle differenti categorie produttive, ed inoltre evidenziano che oggi può essere possibile distinguere anche se per un solo gene, il *Mycoplasma synoviae*.

Tale opportunità potrà aiutare a chiarire la diffusione e l'epidemiologia di tale patogeno nel settore avicolo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. Avian Dis. 2010 Jun;54(2):961-4.
2. Catania S., Ramirez A. S., Fasolato M., Brustolin M., Battanoli G., Bradbury J. Demonstration of two different strains of *Mycoplasma synoviae*

- in tracheal and oviduct specimens on a chicken layer farm affected by Eggshell Apex Abnormalities. XVII Congress of WVPA (World Veterinary Poultry Association). Cancun Mexico 14-18 August 2011 pag. 163
3. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.*38(1):77-85.
  4. Hammond PP, Ramírez 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. Epub 2008 Nov 1.
  5. Hong Y, García M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene vlhA. *Avian Dis.* 2004 Sep;48(3):606-16.

***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.***