

## **APPLICAZIONI DI METODICHE BIOMOLECOLARI PER LA DIFFERENZIAZIONE GENOTIPICA IN *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*.**

Catania S., Battanoli G., Rodio S., Quattieri K., Baldasso E., Iob L.

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

### **Summary**

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) is considered the most important mycoplasma species in the poultry production. Its pathogenic role is related to an important respiratory syndrome, that could be complicated with other avian pathogens. All productive categories can be affected with important production losses. In particular, in breeders a drop in eggs' laying rate and a mild increase of mortality rate are reported. In order to contain the clinical disease different live vaccines are used, mainly in layer and breeders sector, to prevent the transmission and reduce the impact of the MG infections.

Developing a sensitive tool, able to differentiate the MG strains is of great interest to control its spread in poultry industry.

The aim of this study was to characterize the gene coding for the cythadesin protein *Mgc2* and to assess a sensitive method for the differentiation of MG strains. 156 field samples originating from commercial turkey and chickens were investigated. Moreover the MG vaccine strains 6/85 [1] and ts-11 [5], and the reference strains ATCC (Strain 15302-S6) and NCTC (Strain 10115), were included in the study.

Our result showed that *Mgc2* gene can differentiate between strains, through the variability of the nucleotide sequence. These preliminary results allowed improving the diagnosis and giving a chance for the molecular genotyping of MG.

### **INTRODUZIONE**

Il *Mycoplasma gallisepticum* provoca nel pollo e nel tacchino una forma respiratoria piuttosto severa con coinvolgimento delle vie aeree superiori ed interessamento dei seni e conseguente sinusite (in particolare nel tacchino). Negli animali in deposizione si manifesta un importante calo della deposizione di uova correlata anche ad una decolorazione delle stesse. Attualmente i piani di contenimento prevedono la produzione di gruppi MG *free* e l'applicazione di misure di biosicurezza. Tali accorgimenti però in alcuni casi non risultano essere efficaci. Infatti in alcune categorie produttive ed in determinate aree geografiche l'utilizzo di vaccini permette il contenimento delle forme cliniche.

Scopo del presente lavoro è quello di valutare se le metodiche biomolecolari disponibili possono essere utilizzate al fine di differenziazione dei ceppi MG circolanti. A tale fine ci siamo proposti di focalizzarci su il gene *mgc2* che codifica per una proteina "cythadesin", nei campioni conferiti presso il nostro laboratorio.

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 156 campioni di campo provenienti da allevamenti avicoli industriali e qualche campione di provenienza del settore rurale. La procedura di isolamento è stata effettuata sulla base di una nostra procedura interna. Oltre ai ceppi di campo abbiamo utilizzato anche i ceppi MG vaccinali 6/85 [1], e TS-11 [4], ed alcuni ceppi di riferimento ATCC (Strain 15302, S6) and NCTC (Strain 10115).

Estrazione DNA: Il DNA genomico dei campioni isolati è stato estratto e purificato utilizzando il kit d'estrazione "Bacterial Genomic Miniprep" (Sigma-Aldrich) seguendo le istruzioni riportate.

PCR: la reazione a catena della polymerase è stata sviluppata amplificando una regione di circa 300 pb del gene *mgc2* [2] con sequenza nucleotidica assegnata NC\_004829 e locus tag MGA\_0932, codificante per una proteina adesina Mgc2/P32 [3].

I prodotti di amplificazione sono visualizzati in un gel di acrilammide al 7% mediante colorazione con Sybr Gold (Invitrogen) per la visualizzazione agli UV. I campioni positivi per MG sono sequenziati e analizzati mediante allineamento con software MEGA 5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I 156 campioni sottoposti ad analisi provenivano da 115 differenti *outbreaks*. 70 campioni infatti provenivano da specifici allevamenti in cui erano stati campionati diversi capannoni anche con tempistiche differenti, al fine di valutare il mantenimento del genotipo nel medesimo *outbreak*. I nostri risultati mostrano che all'interno dell'allevamento il genotipo *mgc2* si mantiene costante così come in laboratorio dopo alcuni passaggi seriali *in vitro*.

Dai 115 campioni provenienti da 115 differenti focolai di infezione abbiamo potuto osservare 10 differenti genotipi da noi denominati con differenti colori in attesa di una denominazione ufficiale. Tra i genotipi da noi dimostrati abbiamo notato una netta prevalenza di tre specifici genotipi ed in particolare il Light-blue, Pink e Grey con una presenza percentuale del 34%, 30% e 21% rispettivamente.

I ceppi vaccinali testati 6/85 e TS-11 sono stati classificati nei gruppi Orange e Pink rispettivamente, mentre i ceppi di riferimento 15302, (S6) ed il 10115 come Green e Violet.

I dati da noi riportati dimostrano la possibilità di differenziazione biomolecolare all'interno della specie *Mycoplasma gallisepticum*, naturalmente ulteriori studi sono necessari per cercare di valutare se possono esistere specifiche correlazioni tra genotipo e sintomatologia clinica. Sicuramente abbiamo uno strumento aggiuntivo per lo studio dell'epidemiologia di tali particolari microrganismi. Tale metodica fornisce valide basi per il miglioramento della diagnosi e il controllo della diffusione dell'infezione da *M. gallisepticum* che una volta individuata può essere correttamente gestita.

***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.***

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Evans, R. D. & Hafez, Y. S. (1992). Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Dis* 36, 197-201.
- [2] García M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH. (2005) Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens.. *Avian Dis*. Mar;49(1):125-32.
- [3] Papazisi L, Gorton TS, Kutish G, Markham PF, Browning GF, Nguyen DK, Swartzell S, Madan A, Mahairas G, Geary SJ. (2003) The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R(low). *Microbiology*. Sep;149(Pt 9):2307-16.
- [4] Saif Y. M. et al. (2008) Disease of poultry, 12th ed. *Wiley-Blackwell*.
- [5] Whithear, K. G. Soeripto, Harrigan K. E. & Ghiocas, E. (1990). Immunogenicity of a temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J* 67, 168-174.