

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* CIRCOLANTI IN ITALIA TRA IL 2010 ED IL 2012

Taddei R.¹, Tosi G.¹, Barbieri I.², Casadio M.¹, Fiorentini L.¹, Massi P.¹

*1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione Diagnostica di Forlì, Via Marchini, 1 - 47100 Forlì.*

*2 Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Reparto di Genomica - Sede di Brescia, via Bianchi, 9 - 25124 Brescia.*

Summary

Sixtyseven *Mycoplasma gallisepticum* (MG) isolates from Italy were analyzed by molecular methods. The strains were isolated from 2010 to 2012, each one from a different farm.

PCR and PCR RealTime protocols were carried out in order to differentiate MG field strains from the live vaccine strains ts-11 and 6/85. The genetic diversity of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region was also investigated.

INTRODUZIONE

Mycoplasma gallisepticum (MG), patogeno a diffusione mondiale, è sicuramente il micoplasma le cui infezioni causano le maggiori ricadute sull'allevamento avicolo. L'infezione da MG mostra un'ampia varietà di manifestazioni cliniche, variando da infezioni asintomatiche fino a patologie respiratorie croniche con l'interessamento di patogeni secondari (*Escherichia coli*, virus della Bronchite Infettiva Aviare, virus della Malattia di Newcastle) e cospicue perdite economiche dovute principalmente alla gestione delle carcasse, all'aumento dei costi per l'impiego di farmaci ed alla riduzione della produzione e della qualità delle uova. All'interno della specie MG è stata descritta una marcata eterogeneità in rapporto alle proprietà biologiche, tropismo tissutale, virulenza e patogenicità. Attualmente, l'efficacia del controllo da infezione dell'MG si basa da una parte sul mantenimento dei gruppi di riproduttori micoplasma-free insieme all'applicazione di rigorose misure di biosicurezza e dall'altro sull'utilizzo di programmi vaccinali. Nel nostro paese vengono attualmente utilizzati 2 vaccini vivi: il vaccino 6/85 (Merial SAS), originato da un ceppo virulento americano attenuato mediante passaggi seriali (Evans & Hafez, 1992) ed il vaccino ts-11 (Intervet International BV), originato da un ceppo virulento australiano mediante mutagenesi chimica (Whithear et al., 1990). L'utilizzo di vaccini, in aumento negli ultimi anni, ha determinato la necessità di differenziare rapidamente i ceppi di campo dai ceppi vaccinali per una corretta diagnosi della patologia. La rapida identificazione dell'infezione da MG e la diversificazione tra i differenti ceppi di campo è essenziale allo scopo di monitorare efficacemente i focolai, identificare la sorgente di infezione ed improntare efficaci strategie di controllo. Negli ultimi anni stati messi a punto dei protocolli di PCR (Evans et al., 2008) e PCR RealTime (Raviv et al., 2008) per differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di MG utilizzati per prove sperimentali in vivo (ceppi S6, R, Rlow), la cui efficacia sui ceppi di campo non è del tutto nota.

I metodi di sequenziamento di un gene target sono stati recentemente introdotti per gli studi di epidemiologia molecolare. In particolare, per la tipizzazione molecolare di MG sono stati studiati il gene *pvpA* (Boguslavsky et al., 2000; Liu et al., 2001), *gapA* (Goh

et al., 1998; Keeler et al., 1996), *mgc2* (Hnatow et al., 1998) e la regione 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence (IGSR) (Raviv et al., 2007).

Obiettivo di questo lavoro è testare i protocolli di PCR e PCR RealTime già sviluppati per differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di MG utilizzati per prove sperimentali in vivo, su campioni di campo raccolti su tutto il territorio nazionale oltre ad indagare la variabilità a livello molecolare dei ceppi di MG mediante sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati inclusi in questa analisi 67 ceppi di MG isolati da 67 allevamenti diversi collocati in 13 regioni italiane dislocate sull'intero territorio nazionale. Cinque ceppi sono stati isolati nell'anno 2010, 21 nel 2011, e 41 nel 2012. I ceppi provenivano in larga parte da polli (62), ma anche da tacchini (2), fagiani (1), pernici (1) e starni (1). Gli allevamenti di provenienza comprendevano: riproduttori pesanti (6), broiler (19), ovaiole (35), pollastre (2). I campioni conferiti sottoposti ad analisi comprendono animali vivi con segni clinici, animali deceduti, visceri, tamponi tracheali.

Per la maggior parte dei campioni inclusi nell'analisi era noto lo stato anamnestico ed il piano vaccinale eventualmente effettuato nell'allevamento di provenienza.

Identificazione molecolare di MG

I campioni di organo ed i tamponi identificati come positivi per la presenza di MG mediante PCR (OIE, 2008), sono stati sottoposti ad ulteriori indagini molecolari. In particolare, l'estratto di DNA ottenuto mediante DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) seguendo le indicazioni della ditta produttrice è stato sottoposto alle seguenti reazioni PCR e sequenziamento:

• *PCR end-point per l'identificazione dei ceppi vaccinali*

E' stata utilizzata una coppia di primer disegnata sulla sequenza del gene *gapA* (PRUMG32-F/PRUMG36-R – Tabella 1) che amplifica un frammento specifico di 108bp (Evans et al., 2008). In particolare, in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 0.5µM di ogni primer, 12.5µl di Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2X (GoTaq Hot Start Colorless master Mix – Promega) e 5µl di estratto di DNA. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C, 2 min), 40 X (95°C, 45 sec; 62,5°C, 30sec, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 5 min).

PCR real-time per l'identificazione dei ceppi vaccinali

Sono state effettuate due differenti reazioni di PCR RealTime con sonde Taqman per l'identificazione dei due vaccini 6/85 e ts-11 (Raviv et al., 2008). Le due reazioni sono ognuna disegnata su un differente ceppo vaccinale e vengono effettuate in due diversi pozzetti con identica mix di reazione (ad eccezione del primer reverse) ed identico profilo di amplificazione.

Le mix di reazione sono allestite in 25µl totali contenenti: 0.5µM di ogni primer (Tabella 1), 0,05µM di sonda, 12,5µl di Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems) e 5 µl di DNA estratto. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C, 10 min), 40 X (95°C, 15 sec; 61°C, 1 min).

• *Sequenziamento della regione 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequence ed analisi filogenetica*

E' stata amplificata la regione 16S-23S rRNA IGSR e l'amplificato di 812 bp ottenuto è

stato sottoposto a sequenziamento (Raviv et al., 2007). In particolare, in 25µl totali sono state miscelate le seguenti componenti: 0.5µM di ogni primer (MGIGSR F / MGIGSR R, tabella 1), 12.5µl di Go Taq Hot Start Colorless Master Mix 2X (GoTaq Hot Start Colorless master Mix – Promega) e 5µl di estratto di DNA. Profilo di amplificazione: 1 X (95°C, 2 min), 35 X (95°C, 45 sec; 55°C, 30sec, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 5 min). Le reazioni di sequenza sono state approntate a partire dal prodotto PCR previa purificazione su gel (Qiaquick Gel extraction kit – QIAGEN®) con il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem®) secondo le istruzioni del produttore, in entrambe le direzioni, impiegando la stessa coppia di primers utilizzata nell'amplificazione. Le reazioni di sequenza sono state sottoposte ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ga 3130 (Applied Biosystems®). Le sequenze ottenute sono state editate ed analizzate mediante software Lasergene v7.0 (DNASTAR Inc., Madison®, WI, USA). L'analisi filogenetica è stata eseguita su tutti gli amplificati ottenuti, con metodo Neighbour-joining utilizzando il software MEGA versione 5 (Tamura et al., 2011). Il valore di bootstrap considerato nell'analisi, per associare un valore di affidabilità ai rami dell'albero, è di 1000 replicati.

Tabella 1. Sequenza dei primer e probe utilizzati in PCR e PCR RealTime.

Target	Primer/probe	Sequenza	Gene target
ts-11 / 6/85	PRUMG32-F	gaactgattttggaagcgttaaga	<i>gapA</i>
	PRUMG36-R	ccgttatatcatcctgaatctct	
ts-11	<i>mgc2</i> F	ctcaagaaccaactcaacca	<i>mgc2</i>
	<i>mgc2_ts-11</i> R	ggggattaggaataaattgcggat	
	<i>mgc2</i> P	[FAM]cagccaggatttaacacactcag [BHQ]	
6/85	<i>mgc2</i> F	ctcaagaaccaactcaacca	<i>mgc2</i>
	<i>mgc2_6/85</i> R	ggatgaggaccaaatgcggat	
	<i>mgc2</i> P	[FAM]cagccaggatttaacacactcag[BHQ]	
MG	MGIGSR F	gtaggccgggtgattggagtta	16S-23S rRNA IGSR
	MGIGSR R	cccgtagcatttcgaggtttg	

RISULTATI

La PCR end-point per l'identificazione dei ceppi vaccinali è risultata positiva in 19 dei 30 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con uno dei due vaccini commerciali e in 4 dei 37 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati (Tabella 2).

La PCR RealTime per l'identificazione del ceppo vaccinale 6/85 è risultata positiva in 7 di 7 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85, in 28 di 37 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati e in 10 di 23 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con ts-11.

La PCR RealTime per l'identificazione del ceppo vaccinale ts-11 è risultata positiva in 22 di 23 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con ts-11, 28 di 37 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati e 3 di 7 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85.

L'analisi filogenetica con il metodo neighbour-joining delle sequenze della regione 16S-23S rRNA IGSR, ha evidenziato la presenza di 6 cluster nominati Cluster I, II, III, IV, V, VI

(Figura 1). I cluster II e III comprendono i ceppi del vaccino ts-11 e 6/85 rispettivamente. In tabella 2 viene riportata la suddivisione per cluster e per provenienza geografica dei ceppi inclusi nell'analisi.

In tabella 3 sono raccolti i dati ottenuti sui campioni suddivisi per stato vaccinale dell'allevamento di provenienza, della PCR end-point e del sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR.

Quattordici di 23 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con ts-11 sono risultati positivi alla PCR per ceppi vaccinali, di questi nell'analisi di sequenziamento 13 hanno mostrato 100% di identità con il ceppo vaccinale ts-11 ed 1 il 100% di identità con il ceppo 6/85.

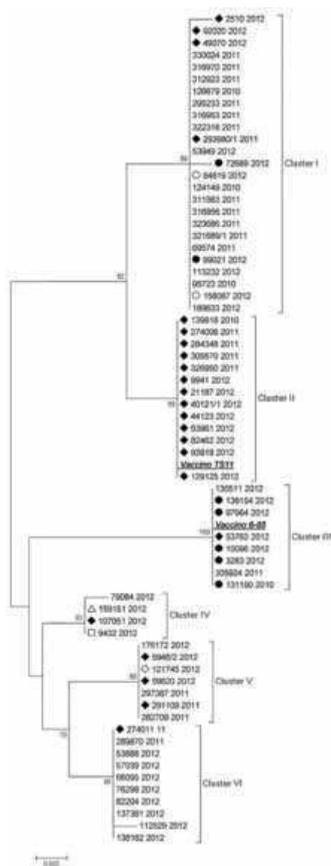


Figura 1. Albero filogenetico costruito analizzando le sequenze nucleotidiche della regione 16S-23S rRNA IGSR con il metodo neighbour-joining. I ceppi vaccinali sono riportate in grassetto corsivo sottolineate. I ceppi provenienti da allevamenti vaccinati con ts11 sono preceduti da un rombo nero, i ceppi provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85 sono preceduti da un cerchio nero, i ceppi isolati da tacchino sono preceduti da un cerchio bianco, il ceppo isolato da tacchino è preceduto da un quadrato bianco, il ceppo isolato da starna è preceduto da un triangolo bianco, il ceppo isolato da fagiano è preceduto da un rombo bianco. Sono riportati solamente i valori di bootstrap >70.

Tabella 2. Distribuzione geografica dei ceppi di MG suddivisi per cluster inclusi nell'analisi.

Regione	C I	C II	C III	C IV	C V	C VI	N° isolati
Abruzzo	1						1
Calabria		1					1
Campania	1	1					2
Emilia Romagna	10	2	4	1	4	3	24
Lazio	1	2		1		3	7
Lombardia	2	2	1			1	6
Marche	3	3	1		1	2	10
Molise				1			1
Puglia	1						1
Sardegna					1		1
Sicilia			1	1			2
Umbria	1						1
Veneto	5	2	1		1	1	10
TOTALE	25	13	8	4	7	10	67

I 9 campioni risultati negativi alla PCR e con identità di sequenza con il ceppo vaccinale ts-11 diversa dal 100% (compresa tra il 98-99,3%) ed il campione risultato positivo in PCR e con il 100% di identità con il ceppo 6/85 sono tutti provenienti da allevamenti in cui i dati anamnestici o le indagini sierologiche effettuate, erano del tutto compatibili con la presenza di un ceppo di campo. Allo stesso modo, anche i 2 campioni provenienti da allevamenti vaccinati con 6/85 e risultati con identità diversa dal 100% con il ceppo vaccinale (97,5- 97,6% identità con il ceppo 6/85) sono ipotizzabili essere ceppi di campo sulla base delle informazioni anamnestiche dell'allevamento di provenienza.

Dei 4 campioni provenienti da allevamenti non vaccinati e risultati positivi in PCR per i ceppi vaccinali, 2 sono risultati avere 100% di identità con il ceppo 6/85.

Tabella 3. Risultati complessivi della PCR end point per l'identificazione dei ceppi vaccinali ed il sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR.

Stato vaccinale	Totali	PCR end-point		Sequenziamento	
		Positivo	Negativo	Identità 100% 6/85	Identità 100% ts11
Vaccinati ts11	23	14	9*	1*	13
Vaccinati 6/85	7	5	2*	5	/
Non vaccinati	37	4	33	2	/

* Riferibili a ceppi di campo

Considerando i ceppi di campo come quelli isolati da allevamenti non vaccinati e quelli isolati da allevamenti in cui erano state fatte vaccinazioni ma assimilabili a ceppi di campo per i dati anamnestici, il tasso dei falsi positivi della PCR end-point è risultato essere 0,1. Tale valore si conferma anche nel caso in cui si limiti l'analisi ai soli ceppi isolati da allevamenti non sottoposti a vaccinazione.

DISCUSSIONE

In questo studio, tecniche molecolari di PCR, PCR RealTime e sequenziamento di un gene target sono state utilizzate per il differenziamento dei ceppi vaccinali 6/85 e ts-11 dai ceppi di campo, oltre che per indagare la variabilità genetica dei ceppi di MG isolati sul territorio nazionale.

Protocolli di PCR end-point e PCR RealTime messi a punto per differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi maggiormente utilizzati negli esperimenti di infezione sperimentale (R, Rlow, S6) sono stati testati su ceppi di campo e su campioni isolati da allevamenti sottoposti a vaccinazione.

Gli stessi campioni sono anche stati sottoposti a sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR (Raviv et al., 2007), sequenza che si è dimostrata essere altamente variabile nei ceppi di campo (con indice di discriminazione maggiore rispetto agli altri geni di MG utilizzati per la tipizzazione molecolare *gapA*, *mgc2* e *pvpA*).

I due protocolli di PCR RealTime testati non si sono rivelati efficaci nel differenziare i ceppi vaccinali dai ceppi di campo, il protocollo di PCR end-point ha mostrato un tasso di falsi positivi del 10%. Tre ceppi di campo (1 isolato da allevamento vaccinato con ts-11 e 2 isolati da allevamenti non sottoposti a vaccinazione) sono risultati positivi alla PCR end-point e con identità del 100% con ceppo vaccinale 6/85. Era già stata segnalata la presenza di ceppi di campo con identità del 100% con il ceppo vaccinale nella sequenza 16S-23S rRNA IGSR (Raviv et al., 2007), così come era stata riportata la positività della PCR end-point data da ceppi geneticamente molto simili al vaccino 6/85 (Evans et al., 2008). D'altra parte, è stato dimostrato come entrambi i vaccini ts-11 e 6/85 abbiano un potenziale molto basso di trasmissione da individuo ad individuo (Ley et al., 1997), anche se l'isolamento di un ceppo 6/85-like da polli non vaccinati (Steinlage et al., 2003), ha già fatto ipotizzare in passato la possibilità di una trasmissione del ceppo vaccinale da polli vaccinati ad animali non vaccinati. Nel nostro caso, non sono stati individuati nelle vicinanze degli allevamenti in cui i 3 ceppi sono stati isolati, allevamenti in cui il vaccino 6/85 venisse utilizzato, ma ulteriori studi molecolari su questi ceppi potrebbero chiarire meglio la loro possibile provenienza.

Due ulteriori campioni di campo sono risultati positivi alla PCR. I due ceppi erano diversi tra loro nella regione sequenziata e mostravano una identità di sequenza calcolata verso i due ceppi vaccinali del 93,3 verso ts-11 (Cluster I) e 98,4 verso 6/85 (Cluster IV), rispettivamente.

Dato il tasso di risultati falsi positivi osservati, questo test può essere utilizzato sui campioni di campo come test preliminare di screening, da abbinare ad altre tecniche di tipizzazione.

L'analisi filogenetica effettuata con metodo neighbour joining ha suddiviso i ceppi analizzati in 5 cluster, non si nota una clusterizzazione su base geografica, né sulla base della specie di isolamento.

A differenza di quanto osservato nel sequenziamento del gene *mgc2* (Raviv et al.,

2007), nel nostro studio nessun ceppo di campo ha mostrato una identità del 100% con il ceppo vaccinale ts-11.

Undici ceppi isolati da allevamenti vaccinati non hanno mostrato identità del 100% con i ceppi vaccinali e sono risultati negativi alla PCR end-point per l'identificazione dei ceppi 6/85 e ts-11. In tutti i casi le sequenze analizzate hanno mostrato almeno 5 mutazioni nella sequenza analizzata. La stabilità del gene osservata nei ceppi ts-11 e 6/85 (Raviv et al., 2007) insieme alla conclusione degli autori che anche solo una differenza in una base implica un differenziamento tra isolati, oltre che i risultati negativi sugli stessi ceppi ottenuti con la PCR end-point ed i dati anamnestici raccolti negli allevamenti di provenienza, ci fanno ipotizzare trattasi in tutti i casi di ceppi di campo.

In conclusione, l'abbinamento della PCR end-point con il sequenziamento della regione 16S-23S rRNA IGSR, si è dimostrato un utile strumento per la tipizzazione molecolare di MG e per la distinzione del ceppo di campo dai ceppi vaccinali.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato realizzato con fondi del Ministero della Salute, Progetto di Ricerca Corrente anno 2010 (IZSLER 2010008).

BIBLIOGRAFIA

Boguslavsky S, Menaker D, Lysnyansky I, Liu T, Levisohn S, Rosengarten R, García M, Yogev D. 2000. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infect Immun.*;68(7):3956-64.

Evans RD, Hafez YS. 1992. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Dis.*; 36(2):197-201.

Evans JD, Leigh SA. 2008. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. *Avian Dis.*;52(3):491-7.

Goh MS, Gorton TS, Forsyth MH, Troy KE, Geary SJ. 1998. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA). *Microbiology.*;144:2971-8.

Hnatow LL, Keeler CL Jr, Tessmer LL, Czymmek K, Dohms JE. 1998. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun.*;66(7):3436-42.

Keeler CL Jr, Hnatow LL, Whetzel PL, Dohms JE. 1996. Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (mgc1) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun.* 1996;64(5):1541-7.

Ley DH, McLaren JM, Miles AM, Barnes HJ, Miller SH, Franz G. 1997. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.*;41(1):187-94.

Liu T, García M, Levisohn S, Yogev D, Kleven SH. 2001. Molecular variability of the adhesin-encoding gene pvpA among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.*;39(5):1882-8.

OIE Terrestrial Manual. 2008. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*,

- M. synoviae*). Chapter 2.3.5: pp 482-496.
- Raviv Z, Callison S, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. 2007. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Dis.*;51(2):555-60.
- Raviv Z, Callison SA, Ferguson-Noel N, Kleven SH. 2008. Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Vet Microbiol.*;129(1-2):179-87.
- Steinlage SJ, Ferguson N, Sander JE, García M, Subramanian S, Leiting VA, Kleven SH. 2003. Isolation and characterization of a 6/85-like *Mycoplasma gallisepticum* from commercial laying hens. *Avian Dis.*;47(2):499-505.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.*; 28(10):2731-9.
- Whithear KG, Soeripto, Harringan KE, Ghiocas E. 1990. Safety of temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J.*;67(5):159-65.