

MONITORAGGIO DELLA COLONIZZAZIONE E PERSISTENZA DEL VACCINO VIVO ATTENUATO PER *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN RIPRODUTTORI PESANTI

Massi P¹., Fiorentini L.¹, Barbieri I.², Giovannetti L.³, Casadio M.¹, Tosi G¹.

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione di Forlì, via Marchini n.1, Forlì FC-forli@izsler.it

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Brescia

³ Medico Veterinario Libero Professionista

Summary

Mycoplasma synoviae is an important causative agent of avian mycoplasmosis. In the present study *vlhA* gene sequence analysis was applied and verified for typing the *Mycoplasma synoviae* live vaccine MS-H strain and field isolates from farm breeder chickens. This tool was applied for 42 field strains of *M. synoviae* isolated from breeder chickens. This analysis revealed that all the strains presented 100% similarity with *M. synoviae* vaccine strain *Mycoplasma synoviae* -H. Nobody *M. synoviae* field strain was identified. In the same time nobody *Mycoplasma s.* was identified in the second pullets period of life.

INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma synoviae* è riconosciuto come un patogeno importante per il pollame allevato in tutto il mondo ed è causa di perdite economiche ingenti nell'allevamento avicolo intensivo. Più comunemente l'infezione da *Mycoplasma synoviae* si manifesta come un'infezione subclinica dell'apparato respiratorio superiore. Comunque la malattia respiratoria può manifestarsi in sinergia con altri patogeni e l'infezione sistemica conduce alla forma sinoviale. Dal 2000 è stata segnalata, in Olanda, una nuova forma da *M. synoviae* che provoca lesioni al polo apicale del guscio, determinando importanti danni economici all'industria delle uova da consumo (Feberwee et al., 2009). Il *Mycoplasma synoviae* può trasmettersi per via orizzontale, per contatto diretto e per via verticale attraverso l'uovo. Nel nostro Paese l'infezione si presenta con alta prevalenza nel pollo da carne. Questo rende necessario ricorrere alla vaccinazione quando l'allevamento da riproduzione si infetta per diversi cicli produttivi nonostante l'attuazione delle misure di biosicurezza previste. Attualmente nel nostro Paese è stato consentito l'utilizzo di un vaccino vivo attenuato denominato "MS-H". Il ceppo MS-H *Mycoplasma synoviae* è stato sviluppato per mutagenesi chimica del ceppo di campo Australiano 86079/7NS ed è un vaccino vivo temperatura-sensibile (*ts+*) usato per il controllo dell'infezione da *M. synoviae* nel pollame a livello mondiale. Per il controllo in campo dei ceppi di *Mycoplasma synoviae* e al fine di poter discriminare fra ceppo vaccinale e ceppi di campo si utilizzano varie tecniche di genotipizzazione (Harada et al., 2009) (Ogino et al., 2011). Una di queste è rappresentata dalla analisi della sequenza di un singolo gene: il gene *vlhA*. Lo spirito del seguente studio è stato di valutare la colonizzazione e persistenza del vaccino MS-H in un allevamento di Riproduttori pesanti e di discriminarlo

da eventuali ceppi di campo mediante la tecnica sequenziamento ed analisi del gene *vlhA*. Nel contempo è stata valutata l'eventuale capacità di resistenza ambientale del ceppo vaccinale nell'allevamento di pollastre successivo a quello vaccinato.

MATERIALI E METODI

Lo studio si è svolto presso un'azienda avicola di Riproduttori pesanti Ross 708 composto da 33.471 femmine e da 3013 maschi distribuiti in 7 capannoni sia in fase di svezzamento che in fase di produzione. I pulcini sono stati accasati in data 29 novembre 2012. I soggetti in questione sono stati controllati sierologicamente in ELISA (Elisa Kit Simbiotic®) e con tamponi tracheali tramite PCR tradizionale per la presenza di *Mycoplasma synoviae* all'età di 40 e 60 giorni risultando negativi. Sono pertanto stati vaccinati con MS-H a 68 giorni di vita con goccia oculare.

Gli animali sono stati controllati dopo 8 settimane dalla vaccinazione al fine di evidenziare la presenza del ceppo vaccinale mediante una PCR tradizionale che amplifica un frammento di 377 bp del gene *vlhA*. I prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers dell'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye Terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500xl (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASTar). Il confronto delle sequenze con quella di riferimento corrispondente al ceppo vaccinale utilizzato è stato effettuato mediante allineamento multiplo con il programma MEGA 5.

Ogni 2 mesi, fino a 12 mesi dalla vaccinazione, i gruppi venivano saggiati sia sierologicamente sia con tamponi tracheali tramite PCR e sequenziamento per *Mycoplasma synoviae*.

Venivano anche raccolti i dati relativi alle patologie e alle produzioni finali del gruppo in questione.

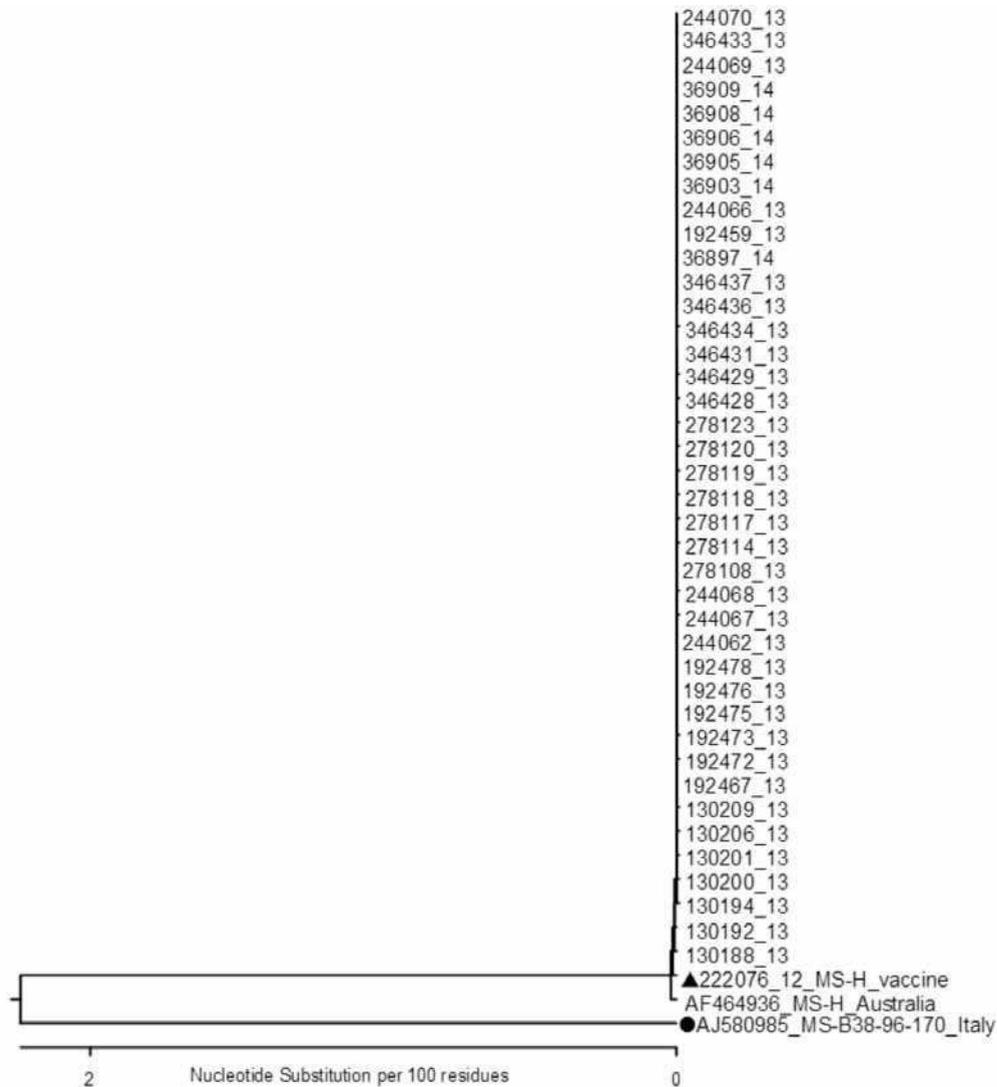
Nell'allevamento della pulcinaia successiva le pollastre erano saggiate sia sierologicamente che in PCR mediante tamponi tracheali.

RISULTATI

A 8 settimane post-vaccinazione tutti i gruppi sono risultati positivi in PCR per *Mycoplasma synoviae* e l'estratto di PCR al sequenziamento risultava presentare un'identità nucleotidica del 100% con il ceppo vaccinale MS-H.

I tamponi tracheali risultavano costantemente positivi per tutto il periodo di controllo in PCR ed i successivi sequenziamenti presentavano identità nucleotidica del 100% verso MS-H (figura 2).

Figura 2. Dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del gene *vlhA* dei campioni di *M. synoviae* oggetto dello studio in cui si evidenzia che tutti i campioni considerati sono identici al vaccino. ▲: sequenza del ceppo vaccinale utilizzato nello studio; ●: sequenza outgroup.



Sierologicamente i gruppi presentavano sieroconversione alta a partire da 10 settimane post vaccinazione e si mantenevano sieropositivi alti anche se con leggera flessione fino alla fine del periodo di osservazione.

Il gruppo registrava una mortalità finale dello 0,18% con una produzione a 65 settimane di vita di 177 uova per gallina ed una percentuale di uova incubate del 96,88%.

Nell'allevamento della pulcinaia successiva le pollastre risultavano negative sia sierologicamente che in PCR tradizionale per *Mycoplasma synoviae*.

DISCUSSIONE

Il gruppo vaccinato ha presentato ottime performances produttive e non ha messo in evidenza problemi sanitari. Il controllo degli animali vaccinati tramite monitoraggio sierologico e sequenziamento di una porzione del gene *vlhA* si è protratto per 12 mesi dal momento della vaccinazione ed ha mostrato la presenza dello stesso ceppo vaccinale in tutti i capannoni per tutto il periodo produttivo. Contemporaneamente non è stata riscontrata la presenza di altri Mycoplasmi. La pulcinaia riutilizzata successivamente non è risultata colonizzata dal vaccino utilizzato nel ciclo precedente.

CONCLUSIONI

In accordo con altri Autori (Bayatzadeh et al., 2014) si evidenzia come la tecnica della tipizzazione molecolare che sfrutta il sequenziamento del gene *vlhA* risulti estremamente utile nel monitoraggio dei gruppi vaccinati al fine di distinguere i ceppi di *M. synoviae* di campo da quelli vaccinali, al contrario delle tecniche sierologiche in Elisa che non ci permettono di distinguere gli anticorpi da vaccinazione da quelli da infezione.

In conclusione si può affermare che la vaccinazione con vaccino termosensibile MS-H in Riproduttori pesanti risulta avere colonizzato in modo persistente gli animali, avere protetto gli stessi dall'infezione da *Mycoplasma synoviae* e di non essere residuo nell'allevamento da pollastra utilizzato per il ciclo di allevamento successivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bayatzadeh MA., Pourbaksh SA., Ashtari A., Abtin AR., Abdoshah M.(2014).Molecular typing of Iranian isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vaccine strain MS-H using *vlhA* Gene. Br Poult Sci. Jan 10.(Epub ahead of print).
2. Feberwee A., Morrow C.J., Ghorashi S.A., Noormohammadi A.H., Landman W.J.M.(2009).Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466.Avian Pathology.38(5), 333-340.
3. Harada K, Tanaka MK, Uchiyama M, Yamamoto T, Oishi K, Arao M, Takahashi T.(2009) Molecular typing of Japanese field isolates and live commercial vaccine strain of *Mycoplasma synoviae* using improved pulsed-field gel electrophoresis and *vlhA* gene sequencing.Avian Disease vol.53,N.4 :538-543.
4. Ogino S, Munakata Y, Ohashi S, Fukui M, sakamoto H, Sekiya Y, Noormohammadi AH, Morrow CJ.(2011)Genotyping of Japanese field isolates of *Mycoplasma synoviae* and rapid molecular differentiation from the MS-H vaccine strain.Avian Disease vol.55 N.2: 187-194.