

## CIRCOLAZIONE DI DIFFERENTI GENOTIPI DI *MYCOPLASMA SYNOVIAE* NEL SETTORE AVICOLO INDUSTRIALE

Moronato M. L.<sup>1,2</sup>, Baldasso E.<sup>1</sup>, Fincato A.<sup>1</sup>, Qualtieri K.<sup>1</sup>, Flaminio B.<sup>1</sup>, Catania S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina aviaria - U.O. Micoplasmici; Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) Università degli Studi di Padova Agripolis Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italia

Corresponding author: scatania@izsvenezie.it

### Summary

*Mycoplasma synoviae* (MS) is an economically important pathogen in poultry industry causing respiratory disease, infectious synovitis and a specific disorder of layers called *Eggshell Apex Abnormalities* (EAA). Several techniques, such as serological, microbiological and molecular methods are available for the diagnosis of MS infection. The analysis of a part of the *vlhA* gene is useful for strain classification. In this study 290 strains of MS collected in backyard and poultry industry were isolated in 2009-2013 and analyzed for nucleotide sequence variability of *vlhA* gene. Basing on our results further investigation are recommended to evidence any possible correlation between genotype, transmission route and clinical signs.

### INTRODUZIONE

*Mycoplasma synoviae* (MS) è attualmente riconosciuto come un importante patogeno del settore avicolo industriale, che nel corso degli ultimi anni ha concentrato su di sé notevole attenzione per un significativo aumento dell'incidenza nel settore avicolo industriale nazionale ed estero.

L'MS può comportare forme respiratorie, forme articolari e infine una sindrome caratteristica della gallina ovaia denominata *Eggshell Apex Abnormalities* -EAA- (Feberwee *et al.*, 2009), tali forme possono aggravarsi nel caso di co-infezione con altri agenti infettivi comportando perdite economiche per scarti in sede di macellazione, aumento dei costi terapeutici, riduzione dell'indice di conversione, ecc.

Attualmente nel controllo delle infezioni da MS si applica la gestione di gruppi di riproduttori MS-free e il rispetto di rigide misure di bio-sicurezza.

La diagnosi di MS è possibile mediante test sierologici (ELISA e SAR), la coltivazione *in vitro* ed esami bio-molecolari. Tra questi ultimi, l'analisi di sequenza di un segmento specifico del gene *vlhA*, che codifica per una lipoproteina di membrana (emoagglutinina) permette la genotipizzazione di differenti ceppi di MS (Bencina *et al.*, 2001).

Sulla base di quanto descritto da Bencina *et al.* (2001) e Hammond *et al.* (2009) si è proceduto alla genotipizzazione dei ceppi di *Mycoplasma synoviae* isolati nel territorio italiano dal 2009 al 2013.

### MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 290 ceppi di MS su un totale di 479 isolati di *Mycoplasma synoviae* provenienti dal settore avicolo industriale nazionale nel periodo 2009-2013.

La selezione dei ceppi è avvenuta secondo i seguenti criteri: anno di isolamento, luogo di provenienza, categoria produttiva, livello di bio-sicurezza (settore riproduzione e settore carne-uova) e analisi bio-molecolare. I ceppi sono stati coltivati mediante procedura interna, con incubazione a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. A crescita avvenuta si è proceduto all'estrazione automatica del DNA (*Maxwell<sup>®</sup>16 Instrument Promega*) e a PCR seguendo le linee descritte da Hammond *et al.* (2009) con alcune modifiche. I prodotti di PCR sono stati verificati su gel 1,5% agarosio e se positivi sono stati inviati al sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state allineate con software MEGA<sup>®</sup> 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) utilizzando come riferimento le sequenze segnalate da Hammond *et al.* (2009).

L'analisi delle sequenze è stata effettuata definendo il "tipo" (A, B, C, D, E, F) dall'analisi del frammento di regione di *vlhA* denominato PRR (*Prolin Rich Repeats*) (Bencina *et al.*, 2001) e il "gruppo" dall'analisi della variabilità della regione MSPB del gene stesso (Hammond *et al.* 2009).

### RISULTATI

Lo studio ha considerato 290 ceppi di MS isolati presso il nostro laboratorio a partire dal 2009.

209 campioni sono riferibili alla specie pollo, 74 alla specie tacchino e i restanti 7 provengono da altre specie avicole minori.

Sulla base del genotipo, è stato possibile riconoscere la presenza di 139 ceppi classificabili come tipo F, 108 tipo D e 28 tipo C. In numero minore sono stati isolati ceppi di MS riferibili ad altri genotipi: H (9), E (2), A (1), G (1). Tra questi sono stati identificati 2 nuovi genotipi, tipo H e tipo G che si aggiungono alla classificazione precedentemente descritta da Bencina *et al.* (2001).

### DISCUSSIONE

Dall'analisi dei dati è possibile evidenziare la presenza di un andamento stagionale degli isolati di *Mycoplasma synoviae*. In particolare, per ciascun anno considerato si possono riconoscere due picchi principali: uno invernale (gennaio) e uno estivo (luglio-agosto).

I ceppi di MS isolati appartengono principalmente a tre genotipi: F, D e C.

Nel 2009 tutti gli isolati del comparto riproduttori sono stati classificati come tipo D, mentre il settore carne si divide in 50% tipo D e 50% tipo F; per i successivi anni (2010-2013) si rinvengono in maniera costante e prevalente i tipi F e D nelle diverse categorie considerate.

Al contrario, i ceppi appartenenti al tipo C esprimono un andamento peculiare: compaiono nel 2010 nel settore carne, nel 2011 e 2012 si evidenziano anche nei riproduttori fino a calare drasticamente in tutte le categorie produttive nel 2013.

Un altro tipo di classificazione proposta da Hammond *et al.* (2009) utilizza l'intera sequenza del gene *vlhA* identificando i "gruppi" e analizzando i nostri dati sulla base del gruppo piuttosto che del tipo si evidenzia una maggiore variabilità tra i ceppi di MS che non permette una facile e rapida valutazione degli stessi.

## CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati ottenuti si evidenzia la maggiore prevalenza di tre genotipi (F, D, C) e di genotipi emergenti. Tale sistema di classificazione applicato ai dati del territorio nazionale, permette di comprendere meglio la distribuzione del patogeno nel settore produttivo. Poche sono ancora le informazioni di tipo anamnestico provenienti dai gruppi avicoli considerati ma sarebbero necessarie ai fini di una eventuale correlazione tra "tipo" e sindrome (respiratoria, articolare, EAA ecc.) al fine di approfondire l'epidemiologia e la patogenesi di *Mycoplasma synoviae* nei diversi settori produttivi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bencina D, Drobnic-Valic M, Horvat S, Narat M, Kleven SH, Dovc P (2001). Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiol Lett.* Sep 11;203(1):115-23.
2. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology.* 38(1):77-85.
3. Hammond PP, Ramirez AS, Morrow CJ, Bradbury JM (2009). 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. *Veterinary Microbiology* 136, 61-68.

*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."*

## VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA IN LABORATORIO DI PRODOTTI A BASE DI BICARBONATO DI SODIO E SILICE PER LA LOTTA AL *DERMANYSSUS GALLINAE*

Pampiglione G.<sup>1</sup>, Scaravelli D.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>3</sup>, Tosi G.<sup>3</sup>, Massi P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Consulente Entomologo, Via A Gramsci n. 7, 47016 Predappio  
email [guglielmo.pampiglione@](mailto:guglielmo.pampiglione@)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,  
via Tolara di Sopra 50, 40064 - Ozzano dell'Emilia (BO)

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e  
dell'Emilia "Bruno Ubertyn", Sezione di Forlì, via Marchini 1, 47122 Forlì

### Summary

A laboratory experiment was provided to evaluate efficacy of a commercial formulate of a product based on silica and sodium bicarbonate against *Dermanyssus gallinae*. The solution at 30% was sprayed in plastic capsules were between 30 and 40 mites were transferred, when product dried, in 3 replicas and in 3 replicas without any treatment. Despite the considerable variability in responses at the day 4 all the treated mites died. The formulation promise good reliability and wide interest as it can be used also in organic farming.

### INTRODUZIONE

*Dermanyssus gallinae* rappresenta il più diffuso ectoparassita nell'industria avicola mondiale. Ha importanza enorme sia come ematofago che indice varie problematiche che possono giungere fino alla morte per anemia e sia per il ruolo di vettore che gli è stato riconosciuto per molti agenti eziologici (Chauve 1998). Si pensa che il 70-80 % degli allevamenti, soprattutto di ovaiole nelle diverse tipologie, ne sia affetto in Italia con ingenti danni stimati (Sparagano et al 2009). Per la sua biologia ed ecologia da sempre è molto difficile controllarlo, con il suo alimentarsi sull'ospite solamente per una mezz'ora e poi portarsi al rifugio anche nei più recondite fessure della struttura e le ripetute velocissime generazioni di cui è capace riuscendo a moltiplicarsi e a muoversi velocemente in tutti i tipi di strutture ove si operino gli allevamenti (Maurer & Baumgärtner, 1994). Il controllo è oggi affidato a una diversificata compagine di acaricidi e spesso il "fai da te" oltre a non avere grandi risultati ingenera anche fenomeni di resistenza e persistenza dei principi attivi nei prodotti destinati all'alimentazione. Nell'ambito delle ricerche in atto presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, sezione di Forlì, è stato provato in laboratorio un nuovo prodotto commerciale a base di bicarbonato di sodio e silice per la lotta a questo acaro.

### MATERIALI E METODI

Il prodotto è composto da Silice amorfa precipitata (sintetica) per il 15% e Bicarbonato di sodio 85%, diluito pronto all'uso al 30% in acqua. Nella sperimentazioni è stata utilizzata una popolazione di acari *Dermanyssus gallinae* eterogenea con larve, ninfe e adulti, simile a quanto si riscontra in campo, proveniente da un allevamento di ovaiole della Romagna. Il prodotto è stato utilizzato