

tal quale nebulizzandolo con uno spruzzatore a mano su capsule plastiche ermetiche di 4 cm di diametro per 1 cm di altezza. Una volta ben asciutte vi sono stati trasferiti gli acari, in numero variabile ma sempre tra i 30 e i 40 esemplari, mediante un ritaglio di carta precedentemente posizionato nei contenitori di trasporto.

Le capsule sono state collocate in termostato a 30°C e 70% RH. Quotidianamente è stata effettuata il conteggio degli acari vivi e morti. Le piastre sono state osservate allo stereo microscopio a 8-32 ingrandimenti. La sperimentazione ha avuto inizio in data 11/2/2014 per concludersi il 15/2/2014.

RISULTATI

Le tre repliche hanno mostrato una decisa variabilità nella sopravvivenza nei primi giorni, così come d'altro canto anche le repliche del controllo e nei primi due giorni questa alta variabilità non rende significativo statisticamente il confronto con il non trattato (t di Student). Dal terzo giorno si nota un rapido decremento della sopravvivenza e il quarto si ha la mortalità globale. Le rette di regressione delle medie sui giorni di riscontro hanno valore nel trattato di $Y = -15,396x + 115,81$ con $R^2 = 0,9831$ mentre nel controllo si attestano su $Y = -24,268x + 120,93$ con $R^2 = 0,9863$.

DISCUSSIONE

Il prodotto appare di grande interesse per lo meno in base ai risultati di laboratorio. La sua struttura rende necessaria una attenta preparazione e spargimento ed avendo azione diretta, meccanica e chimica, deve essere asperso adeguatamente in tutte le parti degli impianti dove gli acari possano rifugiarsi, cioè praticamente ogni punto dello stesso. La sperimentazione potrebbe proseguire migliorando il numero di repliche e verificando l'andamento della variabilità, così come potrebbe anche verificare in campo, come speriamo prevedibile, l'efficacia di fronte al variare delle tipologie di allevamento e delle strutture.

CONCLUSIONI

Il prodotto si presenta di notevole interesse in particolare essendo utilizzabile anche nel settore biologico, dove il controllo dell'Acaro rosso appare per altro decisamente complesso.

Di fronte all'aumentare delle problematiche relative alla specie nell'intero comparto agricolo ogni possibile alternativa nel controllo diviene quindi una opportunità, che deve obbligatoriamente passare da una attenta sperimentazione e dall'approccio integrato, dove il tecnico specializzato divenga in pianta stabile uno degli elementi di guida della produzione, abbandonando facilonerie e improvvisazioni.

BIBLIOGRAFIA

- Chauve C, 1998. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol* 79:239-245.
- Maurer V. and J. Baumgärtner, 1994. A population model for *Dermanyssus gallinae* (Acari, Dermanyssidae). *Exp Appl Acarol* 18:409-422.
- Sparagano O., Pavličević A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, Mul M, van Emous R, le Bouquin S, Hoel K and MA Cafiero, 2009. Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Exp Appl Acarol* 48(1-2):3-10.

MYCOPLASMA GALLISEPTICUM NEL SETTORE AVICOLO: STUDIO DEI CEPPI CIRCOLANTI NEGLI ULTIMI TRE ANNI

Rodio S.¹, Moronato M. L.¹⁻², Sattin E.¹, Matucci A.¹, Gobbo F.¹⁻², Catania S.¹

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

² 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 gallisepticum (MG) is one of the most important avian pathogen responsible of significant economic losses in poultry industry. MG causes infectious sinusitis in turkeys and it contributes to the chronic respiratory disease in chickens (CRD). It has also been reported in non commercial flocks (partridges, geese, pheasants) and recently became an emerging disease in house finches.

MG diagnosis is mainly based on serology, pathogen cultivation in selective media, and on immunocoloration techniques. Moreover modern PCRs are considered to be more sensitive tool for epidemiological analyses and for the differentiation of circulating MG strains.

In this study 146 MG strains collected in the backyard and poultry industry were isolated in 2010-2013 and analyzed for their nucleotide sequence variability for *Mgc2*, *gapA* and *MG ISR* genes.

INTRODUZIONE

In ambito aviario le infezioni da *Mycoplasma gallisepticum* (MG) rappresentano per il settore industriale un'importante causa di perdite economiche. L'infezione da MG colpisce prevalentemente l'apparato respiratorio di polli e tacchini, con conseguente forma respiratoria grave; tutti i settori produttivi risultano essere sensibili a tale patogeno. Il controllo di MG si basa principalmente sull'eradicazione dello stesso attraverso la creazione e mantenimento di gruppi MG-free, attraverso anche un corretto ed oculato piano di bio-sicurezza.

MG è caratterizzato da elevata variabilità antigenica, tramite la quale il patogeno riesce a persistere nell'ospite evadendo la risposta immunitaria, quindi l'utilizzo di metodiche bio-molecolari, direttamente sul ceppo batterico isolato, può essere utile ai fini di una sua tipizzazione. L'analisi della sequenza di proteine simili alle adesine, come il gene codificante per una *cythadesin*-Mgc2 è importante ai fini dell'indagine genotipica. Tra queste l'espressione di entrambe *GapA* e *CrmA*, i cui geni mostrano omologia con *Mgc2*, è risultata indispensabile per la cito-aderenza e la patogenicità di MG (Papazisi *et al.*, 2002).

In questo studio 146 isolati di *Mycoplasma gallisepticum* sono stati classificati e analizzati secondo la variabilità nella sequenza del gene *Mgc2*. Inoltre è stata eseguita amplificazione del gene *gapA* in base a quanto descritto da Evans *et al.* (2008). I diversi ceppi di MG sono stati organizzati in un *database* secondo diversi criteri di selezione: anno di isolamento (2010-2013), luogo di provenienza, sintomatologia (se riportata

come dato anamnestico), categoria produttiva, livello di biosicurezza e analisi biomolecolare. Tale indagine ha permesso di valutare le eventuali differenze genotipiche di *Mycoplasma gallisepticum* in isolati recenti provenienti dal territorio italiano.

MATERIALI E METODI

Isolamento e identificazione: sono stati analizzati 146 campioni diagnostici provenienti da singoli focolai di infezione, dei quali 126 di provenienza industriale e 20 di origine rurale. I tamponi prelevati sono stati stemperati in brodi di crescita selettivi per micoplasmi e incubati a 37°C con 5% CO₂. Nello studio sono stati inclusi ceppi vaccinali (6/85 e TS-11) e di riferimento (15302 ATCC e 10115 NTCC), già presenti in laboratorio.

Estrazione DNA: in seguito a viraggio di colore della brodo coltura (ad indicare la crescita del patogeno) si procede ad estrazione del DNA mediante metodo automatico (Maxwell016 Instrument Promega).

Analisi biomolecolare: si sono sviluppate 3 diverse reazioni di PCR amplificando:

- 1) una regione del gene *Mgc2*, MGA_0932, codificante per una proteina adesina Mgc2/P32 come descritto da Garcia *et al.* (2005).
- 2) una regione del gene *gapA* come descritto da Evans *et al.* (2008).
- 3) la regione 16S-23S rRNA ISRs *Intergenic Spacer Region sequence* come descritto da Raviv *et al.* (2007).

Sequenziamento del DNA e analisi: i prodotti di amplificazione risultati positivi per il gene *Mgc2* e *MG IGSR* sono stati sequenziati e analizzati mediante allineamento con software MEGA^a 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Alle sequenze ottenute per il gene *Mgc2* è stato associato un colore per ciascun genotipo. Per i ceppi considerati vaccinali (6/85 e TS-11) è stato attribuito rispettivamente il colore *orange* e *pink*; per gli altri ceppi di riferimento: *violet* (10115 NCTC) e *green* (15302 ATCC). Altri genotipi sono stati identificati come *grey*, *light-blue* e *green*, altri colori sono stati assegnati ai ceppi meno rappresentati.

RISULTATI

Lo studio è stato principalmente focalizzato su campioni di origine industriale o rurale e nel dettaglio: 60 della categoria pollo, 76 tacchino e 10 delle specie minori. Nell'arco dei 3 anni di attività (2010-2013) sono stati raccolti 180 campioni di provenienza italiana, per un totale di 231 sequenziamenti.

In base all'identificazione su sequenza genica *Mgc2* (Garcia *et al.*, 2005) sono stati analizzati 146 isolati con le seguenti prevalenze: *pink* (58), *light-blue* (44), e *grey* (28). Altri genotipi sono stati dimostrati seppur in numero limitato tra i quali l'*orange*, che rappresenta il ceppo di origine vaccinale 6/85, e in ordine decrescente di prevalenza *green*, *fucsia*, *blue*, *black*, *red* e *yellow*.

Parallelamente è stata effettuata una PCR per il gene *gapA* (Evans *et al.*, 2008), positiva ai ceppi di riferimento vaccinali 6/85 e TS-11, inoltre a tale metodica sono risultati positivi tutti i ceppi precedentemente classificati come *orange* e solamente una parte di ceppi appartenenti al tipo *pink*. Infine nessuna positività per la PCR *gapA* è stata riscontrata negli altri colore-tipo.

I positivi alla PCR per il gene *gapA* e catalogati come *orange* sono stati isolati in gruppi classificati come a bassa bio-sicurezza.

Infine nei ceppi riscontrati con maggiore frequenza (*pink*, *light-blue* e *orange*) è stata

eseguita anche l'analisi del gene *ISR* (Raviv *et al.*, 2007) evidenziando un unico gruppo per gli *orange* e gruppi *ISR* differenti per il *pink* e il *light-blue*.

DISCUSSIONE

Analizzando l'andamento degli isolati di MG nel tempo si osserva che questo patogeno rispecchia la stagionalità tipica del genere *Mycoplasma spp*, con un picco invernale tra dicembre e gennaio ed uno tardo estivo.

Gli aspetti legati a tale correlazione, come le variazioni di temperatura, lo spargimento delle lettiere, l'area geografica di provenienza o altri fattori meriterebbero un approfondimento per meglio chiarire la diffusione ed epidemiologia della micoplasmosi. In generale i campioni provenienti dal settore industriale e rurale mostrano la presenza di tre genotipi principali: *pink*, *light-blue* e *grey*.

Tuttavia l'analisi comparata dei geni *Mgc2* e *ISR* consente di discriminare tra ceppi di origine vaccinale (6/85) e ceppi di campo.

Infine sulla base dei dati raccolti all'interno del settore industriale la possibile associazione tra sindrome clinica e genotipo associato suggerisce che alcuni ceppi appartenenti al genotipo *light-blue* mostrino una sintomatologia clinica piuttosto blanda, inoltre al tipo *pink* si sono associate forme respiratorie conclamate, tuttavia risulta necessaria un'implementazione dei dati anamnestici.

CONCLUSIONI

La raccolta e l'elaborazione di dati basata su isolati di MG nel corso degli anni ha permesso di evidenziare nuovi aspetti dei ceppi circolanti nel territorio nazionale. L'analisi multipla di diversi geni *Mgc2* - *gapA* - *MGISR* pone l'accento sulla complementarietà tra metodiche per la diagnosi e la migliore comprensione dell'epidemiologia delle micoplasmosi. Risulta utile stabilire una possibile correlazione tra genotipo e dati anamnestici al fine di definire eventuali pato-tipi o ceppi con particolare tessuto tropismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Evans JD1, 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. Sep*; 52(3):491-7.
2. Garcia 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, Frasca S Jr, Gladd M, Liao X, Yogev D, Geary SJ (2002) GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infect Immun. Dec*; 70(12):6839-45.
4. 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. Jun*; 51(2):555-60.

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."