

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *MYCOPLASMA SPP.* NELL'AVIFAUNA SELVATICA: RISULTATI PRELIMINARI

Moronato M.L.¹, Fincato A.¹, Boscarato M.¹, Tonellato F.R.¹, Catania S.², Gobbo F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 - Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (Padova).

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT1 - Laboratorio di Medicina Aviare, Verona.

Summary

Although the role of wild animals in the pathogenesis and epidemiology of many infectious diseases has been established, less is known about *Mycoplasma spp.* presence and distribution in wild birds in Italy. The availability of wild birds carcasses rescued from the CRAS of Rovigo and delivered to the Avian Medicine Laboratory of the IZSVe, allowed us to include also *Mycoplasma spp.* investigation in a monitoring program of infectious diseases (West Nile virus, Avian Influenza virus, Avian Paramyxovirus-1). A total number of 192 tracheal samples were collected from adult and sub adult wild birds, rescued from Venezia, Padova and Rovigo provinces and belonged to different avian species with migrating, partially migrating and residential behavior. Among the analyzed samples a total number of 48 tracheal swabs, belonging to different provinces and avian species, resulted positive for *Mycoplasma spp.* at cultivation.

Whereas the 16s-rDNA-PCR-DGGE for *Mycoplasma spp.* identification was not always conclusive, it was possible to exclude the presence of major avian mycoplasmas (i.e *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma iowae*).

These preliminary results evidence the presence of *Mycoplasma spp.* in different species of wild birds and suggest the need of deeper investigation on their characteristics (microbiology and identification), distribution, epidemiology and possible pathogenic role for poultry.

INTRODUZIONE

Gli animali selvatici possono contribuire alla trasmissione e diffusione di importanti agenti patogeni. Nell'ambito delle micoplasmosi avicole l'attenzione della comunità scientifica e del campo si è concentrata principalmente su quelle specie batteriche considerate di impatto da un punto di vista sanitario ed economico, quali *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma meleagridis* e *Mycoplasma iowae*. Poche sono invece le informazioni disponibili sulla loro presenza nell'avifauna selvatica e sulla circolazione di altre specie di micoplasmi al di fuori del settore avicolo industriale e rurale, soprattutto in Italia.

Obiettivo del presente studio, del quale si riportano i risultati preliminari ad oggi disponibili, è valutare la presenza di *Mycoplasma spp.* nell'avifauna selvatica, stimarne la prevalenza ed indagarne il possibile ruolo epidemiologico.

Per tale scopo sono state utilizzate le carcasse di uccelli selvatici provenienti dal Centro Di Recupero Fauna Selvatica Provincia di Rovigo (CRAS) e conferite presso il Laboratorio di Medicina Aviare della SCT1 dell'Istituto Zooprofilattico

Sperimentale delle Venezie di Legnaro (Padova), dove nell'ambito delle attività di sorveglianza passiva della fauna selvatica per malattie quali la West Nile, l'Influenza aviaria e la Malattia di Newcastle, sono state campionate anche per la sorveglianza passiva di specie batteriche appartenenti al genere *Mycoplasma spp.*

MATERIALI E METODI

Tra settembre 2017 e maggio 2018 un numero di 192 tamponi tracheali sono stati effettuati a partire da carcasse di soggetti adulti-subadulti dell'avifauna selvatica proveniente dalle province di Venezia, Padova e Rovigo.

Le matrici biologiche campionate sono state immediatamente congelate (-20°C) e stoccate in attesa di essere destinate all'isolamento culturale per *Mycoplasma spp.* secondo una procedura interna del laboratorio basata sul manuale OIE. Un numero complessivo di 192 campioni sono stati ad oggi stemperati in brodo culturale (Experience®), incubati a 37°C ed al 5% di CO₂ e giornalmente sono stati valutati eventuali segni di crescita/attività metabolica (cambiamento di colore o intorbidimento del terreno liquido, presenza di colonie di aspetto caratteristico – *eggshell fried colonies*- su terreno agarizzato). Ciascun campione è stato inoltre sottoposto su terreno solido ai test biochimici della nisina e della digitonina, con conferma della positività per *Mycoplasma spp.* qualora evidenziata, dopo 24 ore di incubazione, resistenza nei confronti della nisina (assenza di alone di inibizione) e sensibilità alla digitonina (presenza di alone di inibizione). Il campione è stato considerato negativo se dopo 3 settimane di incubazione non sono stati rilevati segni di crescita tipici del genere *Mycoplasma*.

In caso di positività all'esame culturale, un'aliquota di 300µL di brodocoltura è stata quindi sottoposta ad estrazione del DNA con lo strumento automatico Maxwell LEV® Blood DNA kit (Promega), secondo le indicazioni fornite dal produttore. L'identificazione e la differenziazione dei campioni è avvenuta tramite 16s-r-DNA-PCR-DGGE *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, secondo quanto descritto da Mc Auliffe *et al.* (2005).

In alcuni casi tale metodica non ha permesso di raggiungere ad oggi un'identificazione specifica di *Mycoplasma spp.* e si prevede quindi nel prossimo futuro di amplificare parte del gene 16s rRNA per il successivo sequenziamento, che avverrà secondo il metodo Sanger. I prodotti ottenuti dal sequenziamento saranno analizzati con l'utilizzo del software BLAST – *Basic Local Sequence Alignment*.

RISULTATI

Complessivamente sono stati analizzati 192 campioni (tampone tracheale), di soggetti adulti e subadulti, afferenti a 48 specie selvatiche e provenienti dalle province di Venezia (128), Padova (17), Rovigo (41) e 6 campioni per i quali la georeferenziazione non risultava disponibile (figura 1). Di queste, 34 specie sono state classificate come uccelli migratori, 96 come parzialmente migratori e 62 come stanziali. Le specie selvatiche che sono state campionate e la relativa positività sono descritte in dettaglio in tabella 1.

48 campioni sono risultati positivi con il maggior numero di positività nella provincia di Venezia (33), seguita da quella di Rovigo (10) e Padova (4), mentre 1 campione risultato positivo non presentava riferimenti sulla zona di provenienza (figura 2).

Sulla base dei dati ad oggi disponibili è possibile evidenziare come il maggior numero

di campioni positivi sia stato riconosciuto in animali parzialmente migratori (30/96), seguiti dagli uccelli stanziali (16/62) ed infine dagli animali migratori (2/34) (figura 3). Nel dettaglio, tra gli animali parzialmente migratori analizzati è stato possibile riconoscere 1/1 campione positivo da colombaccio, 1/2 da falco pellegrino, 1/6 da gabbiano comune, 13/25 da gabbiano reale, 7/16 da gheppio, 2/5 da gufo comune, 1/6 da merlo, 1/7 da svasso, 2/6 da svasso maggiore e 1/2 da tuffetto. Per quanto concerne invece le specie stanziali sono state osservate le seguenti positività: 1/2 da cormorano, 1/2 da gazza ladra, 1/6 da piccione, 8/23 da poiana e 5/8 da tortora dal collare. Infine, per quanto concerne le specie migratorie è stata evidenziata 1/2 positività da falco di palude e 1/1 da nitticora.

Tutti i campioni risultati positivi all'esame colturale sono stati successivamente sottoposti a 16s-rDNA-PCR-DGGE per l'identificazione di specie di *Mollicutes*. Ciascuna analisi è stata svolta includendo, in ogni gel di DGGE, un pannello di controlli positivi di *Mycoplasma spp.* di pertinenza aviaria del settore industriale e rurale. L'identificazione di specie del campione incognito avviene tramite la comparazione del bandeggio evidenziato su gel con quello di controlli noti.

Tutti i campioni analizzati hanno evidenziato un bandeggio (*pattern*) collocato all'interno della zona di pertinenza dei micoplasmii, confermandone quindi il comportamento in sede microbiologica e la positività.

In nessun campione ad oggi analizzato è stato osservato il bandeggio specifico dei più noti micoplasmii del campo avicolo, quali *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* (MM), *M. iowae* (MI), *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* e *M. imitans* (MIIm). Nonostante ciò, un campione isolato da poiana ha evidenziato su gel di DGGE un *pattern* simile ad MS. Le caratteristiche metaboliche del ceppo evidenziate in fase microbiologica ed ulteriori approfondimenti biomolecolari hanno permesso di escludere questa possibilità, confermata anche dall'identificazione ottenuta tramite sequenziamento (99% *Mycoplasma* 27639).

Analogamente, un campione di gabbiano comune ritrovato in provincia di Venezia ha evidenziato un bandeggio situato nella zona di pertinenza di *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma imitans*, ma analisi biomolecolari aggiuntive hanno permesso di escludere la presenza di MG o MIIm e di identificare la specie come 99% *Mycoplasma* 27635, filogeneticamente molto vicino a MG e MIIm.

Tramite metodica DGGE è stato possibile identificare 3 campioni di tortora dal collare ed 1 di gheppio come positivi a *Mycoplasma columbinum*, mentre 4 campioni (piccione, colombaccio, gufo comune, tortora dal collare) sono stati identificati come *Mycoplasma columborale*.

Nella maggior parte dei casi l'identificazione di specie tramite questa metodica non è stata possibile, a causa della mancata corrispondenza tra il bandeggio espresso dai campioni analizzati e quello dei controlli inseriti; si prevede quindi di analizzare questi campioni tramite amplificazione di parte del gene 16s rRNA e successivo sequenziamento.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati preliminari ad oggi disponibili si può osservare come le attività di campionamento su avifauna selvatica adulta e sub-adulta, stanziale/parzialmente migratoria/migratoria abbiano evidenziato la positività per *Mycoplasma spp.* da tampone tracheale con una prevalenza del 25%. Risultano interessanti le numerose

positività del gabbiano reale, dei columbiformi e dei rapaci stanziali o migratori. La metodica DGGE tramite l'utilizzo di campioni noti (controlli positivi aviari di pertinenza industriale e rurale) non è risultata sempre conclusiva nella attribuzione di specie di *Mycoplasma spp.* ma ha comunque consentito di escludere l'appartenenza dei campioni selvatici alle specie di interesse per il settore industriale (MS, MG, MM, MI, MIm) o a specie di micoplasmi normalmente presenti nel settore rurale (*M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners*, *M. glycyphylum*, *M. pullorum*). D'altro canto in base ai dati disponibili in laboratorio possiamo affermare di non aver mai isolato micoplasmi dell'avifauna selvatica nel settore rurale od industriale. Seppur questo dato potesse risultare scontato nel settore industriale non si può dire la stessa cosa per quello rurale, in cui spesso gli animali vivono all'aperto, le misure di biosicurezza sono limitatissime e quindi la promiscuità con specie selvatiche può risultare frequente.

Questi dati che necessitano di ulteriori approfondimenti sembrano comunque escludere una possibile trasmissione di micoplasmi in ambito selvatico-rurale, selvatico-industriale e viceversa, o per la elevata speciazione di queste specie batteriche o per fattori ancora sconosciuti, legati alla patogenesi e all'epidemiologia delle micoplasmosi.

I risultati delle analisi di sequenziamento e di filogenesi potrebbero permettere di confermare tali dati preliminari, di evidenziare la presenza di nuove specie di micoplasmi o di specie filogeneticamente affini ai micoplasmi di pertinenza industriale/rurale. Inoltre i dati ottenuti potrebbero essere utili per implementare la metodica DGGE affinché possa essere fruibile anche per l'identificazione di *Mycoplasma spp.* nell'avifauna selvatica.

Tabella 1. Specie selvatiche analizzate e relativa positività.

Specie animale	Positivi/Totale
Airone cenerino (<i>Ardea cinerea</i>)	0/3
Airone rosso (<i>Ardea purpurea</i>)	0/1
Allocco (<i>Strix aluco</i>)	0/2
Assiolo (<i>Otus scops</i>)	0/1
Balestruccio (<i>Delichon urbica</i>)	0/1
Barbagianni (<i>Tyto alba</i>)	0/5
Beccaccia (<i>Scolopax rusticola</i>)	0/5
Beccacino (<i>Gallinago gallinago</i>)	0/1
Cigno reale (<i>Cygnus olor</i>)	0/5
Civetta (<i>Athene noctua</i>)	0/3
Colombaccio (<i>Columba palumbus</i>)	1/1
Cormorano (<i>Phalacrocorax carbo</i>)	1/2
Cornacchia grigia (<i>Corvus cornix</i>)	0/3
Falco di palude (<i>Circus aeruginosus</i>)	1/2

Falco pellegrino (Falco peregrinus)	1/2
Falco pescatore (Pandion haliaetus)	0/2
Frosone (Coccothraustes coccothraustes)	0/1
Gabbiano comune (Chroicocephalus ridibundus)	1/6
Gabbiano reale (Larus michahellis)	13/25
Gallinella (Gallinula Chloropus)	0/3
Garzetta (Egretta garzetta)	0/3
Gazza ladra (Pica pica)	1/2
Germano reale (Anas platyrhynchos)	0/6
Gheppio (Falco tinnunculus)	7/16
Ghiandaia (Garrulus glandarius)	0/3
Gufo comune (Asio otus)	2/5
Gufo di palude (Asio flammeus)	0/1
Merlo (Turdus merula)	1/6
Nitticora (Nycticorax nycticorax)	1/1
Oca (Anser anser)	0/1
Pettirosso (Erithacus rubecula)	0/2
picchio rosso mezzano (Leiopicus medius)	0/1
picchio verde (Picus viridis)	0/3
Piccione (Columba livia)	1/6
Poiana (Buteo buteo)	8/23
Porciglione (Rallus aquaticus)	0/1
Regolo (Regulus regulus)	0/1
Rondone (Apus apus)	0/4
Scricciolo (Troglodytes troglodytes)	0/1
Smeriglio (Falco colombarius)	0/1
Sparviere (Accipiter nisus)	1/7
Sterna (Sterna)	0/2
Strolaga minore (Gavia stellata)	0/3
Svasso maggiore (Podiceps cristatus)	2/6
Tarabusino (Ixobrychus minutus)	0/2
Tordo bottaccio (Turdus phylomelos)	0/1
Tortora dal collare (Streptopelia decaocto)	5/8
Tuffetto (Podiceps ruficollis)	1/2

Figura 1. Distribuzione territoriale dei 192 campioni ad oggi analizzati.

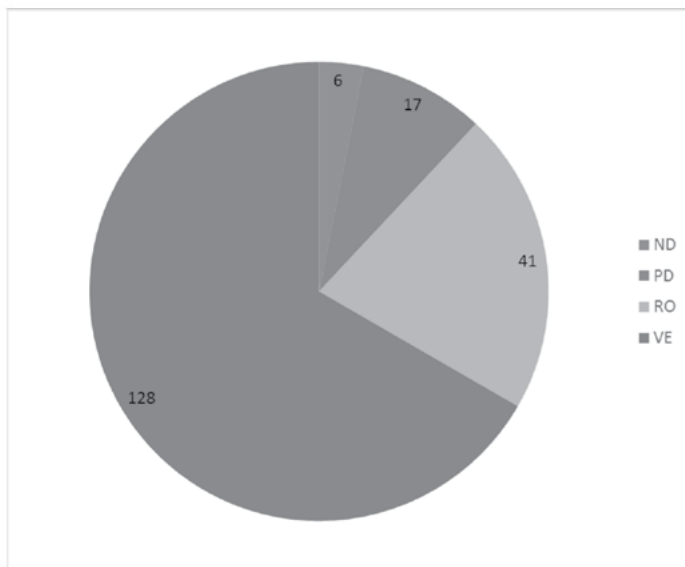


Figura 2. Distribuzione territoriale dei 48 campioni risultati positivi (%).

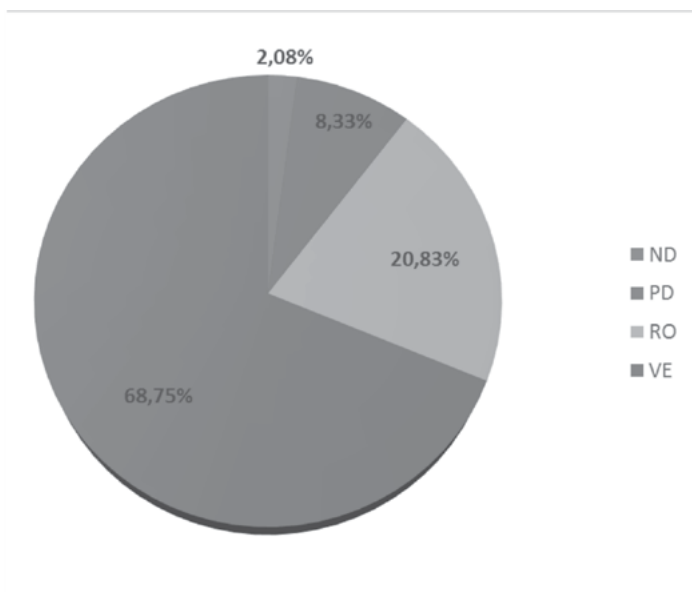
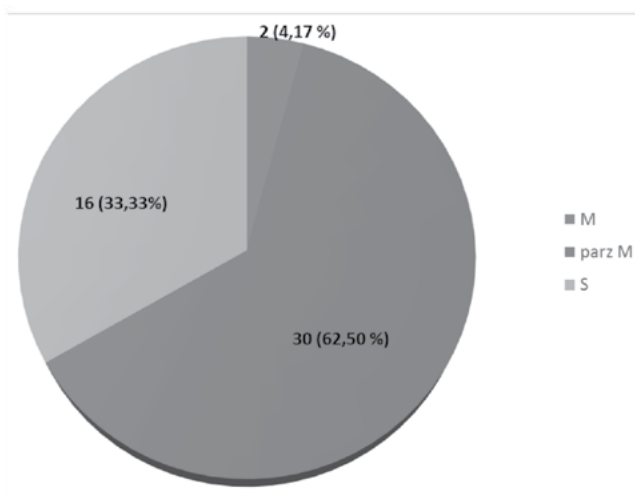


Figura 3. Classificazione dei campioni risultati positivi in base al comportamento migratorio (blu), parzialmente migratorio (rosso) e stanziale (verde).



BIBLIOGRAFIA

1. O.I.E. Manual of Standards and Vaccines test 2008 - Chapter 2.3.5. - Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)
2. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol.* 54:731-9.
3. Pennycott TW, Dare CM, Yavari CA, Bradbury JM (2005). *Mycoplasma sturni* and *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds in Scotland. *Vet Rec.* 156:513-515.
4. Lierz M, Hagen N, Hernandez-Divers SJ, Hafez HM. (2008). Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 44:845-850.
5. Miles R and Nicholas R. *Methods in molecular biology* (1998). In: *Mycoplasma protocols*, Hymana Press, 104:145-165.